1. Chi è il colpevole?

L'esperimento illustrato riguarda l'identificazione personale attraverso il test del DNA.

Si procederà all'analisi di brevi sequenze di nucleotidi, dette microsatelliti, presenti nel DNA dei campioni in esame; queste sequenze, amplificate con la tecnologia della PCR, sono separate mediante elettroforesi su di un particolare substrato di gel (agarosio).
Il risultato finale consiste nella visualizzazione di una sorta di codice a barre univoco e diverso per ciascun individuo.

Il problema dell'identificazione personale

I piccoli rilievi presenti sui polpastrelli delle nostre dita sono unici per ciascuno di noi e permettono di distinguerci l'un l'altro sin dalla nascita. Si chiamano **impronte digitali** e sono note fin dall'antichità; infatti i babilonesi le usavano come firma in fondo alle tavolette di argilla fresca su cui scrivevano le leggi dello stato. Già Quintiliano, nella Roma antica, aveva usato le impronte digitali per trovare l'assassino di una donna; nel 1902, per la prima volta, esse furono presentate come capo d'accusa in un'aula della corte inglese per incastrare uno scassinatore che aveva lasciato la propria impronta sulla vernice fresca della finestra vicino alla cassaforte. Da allora, ladri e criminali, consapevoli della possibilità di essere riconosciuti dalle impronte, sono soliti indossare i guanti per evitare di essere identificati. Ma non basta più!!!
Dal 1986, anno in cui per la prima volta viene usata l'impronta genetica scritta nel DNA per condannare un assassino, anche i criminali più accorti hanno di che preoccuparsi: mediante l'analisi genetica, infatti, si può effettuare un nuovo tipo d'identificazione detta "fingerprinting del DNA" o "test del DNA".
Il **fingerprinting del DNA** è una tecnica di Genetica molecolare utilizzata in tutti quei casi, medici o forensi, in cui è necessario effettuare l'identificazione di un individuo. Oltre che nei laboratori di ricerca in Genetica molecolare, questa tecnica è usata nei laboratori di Medicina legale di tutto il mondo. Può essere applicata all'identificazione di materiale per attribuirne l'appartenenza a vittime o sospetti, come succede nei casi di incidenti aerei, delitti, stupri, o anche alla determinazione di relazioni familiari come la paternità. Questa tecnica consente di produrre il profilo genetico di un individuo partendo da quantità molto piccole di materiale biologico anche non perfettamente conservato. È sufficiente una quantità minima di cellule, come un capello con il bulbo, le tracce di saliva su un bicchiere o su una sigaretta, per poter effettuare il test.
Il test del DNA si basa sull'analisi di particolari sequenze nucleotidiche, denominate **microsatelliti**, presenti nel genoma di ogni individuo: dal campione in esame viene estratto il DNA e,

Conoscenze propedeutiche

- Struttura del DNA
- Concetti di: gene, *locus*, allele
- Elettroforesi
- PCR

Figura 1.1
Fotografia del risultato di una elettroforesi su gel d'agarosio con la distribuzione delle bande dei microsatelliti di due individui diversi.

mediante la tecnica della **Polymerase Chain Reaction** (**PCR**), vengono amplificate le regioni relative ad alcuni microsatelliti; i prodotti della PCR sono poi analizzati tramite elettroforesi (fig. 1.1).

Un po' di teoria - Tutti uguali, tutti diversi

Il sequenziamento completo del genoma dell'uomo e di molti altri organismi eucariotici ha permesso di ottenere un quadro dettagliato della sua struttura e organizzazione (fig. 1.2).
Una delle osservazioni più sorprendenti emerse dal sequenziamento del genoma umano è che il numero dei geni (il cui ordine di grandezza, tra l'altro, è sostanzialmente conservato anche tra genomi di diversa dimensione e complessità) è molto minore di quanto ci si attendeva: 20 000 - 23 000 geni. Altra osservazione sorprendente è che le sequenze codificanti occupano solo circa il 2% di tutto il genoma umano, mentre il restante 98% contiene sequenze non codificanti. Il sequenziamento del genoma umano ha confermato che il DNA non codificante extragenico è prevalentemente costituito da **DNA ripetitivo**, cioè da sequenze di basi più o meno brevi ripetute in tandem (testa-coda) molte volte e presenti in blocchi distribuiti in vari siti (*loci*) sui diversi cromosomi (fig. 1.3). Queste ripetizioni sono presenti per lo più a livello dei centromeri (DNA satellite, costituito da sequenze di 5-50 paia di basi ripetute fino a un milione di volte) e dei telomeri (DNA minisatellite, costituito da sequenze di 6-100 paia di basi ripetute migliaia di volte).

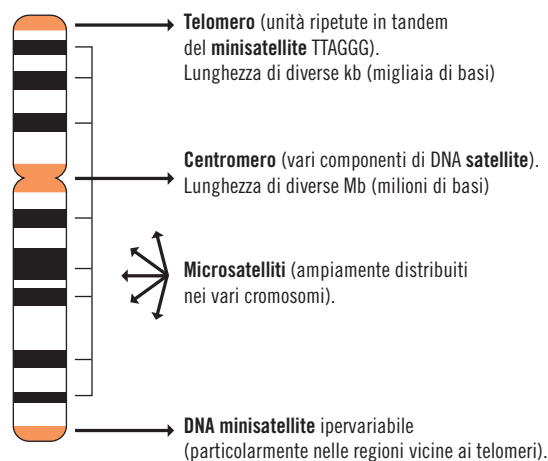
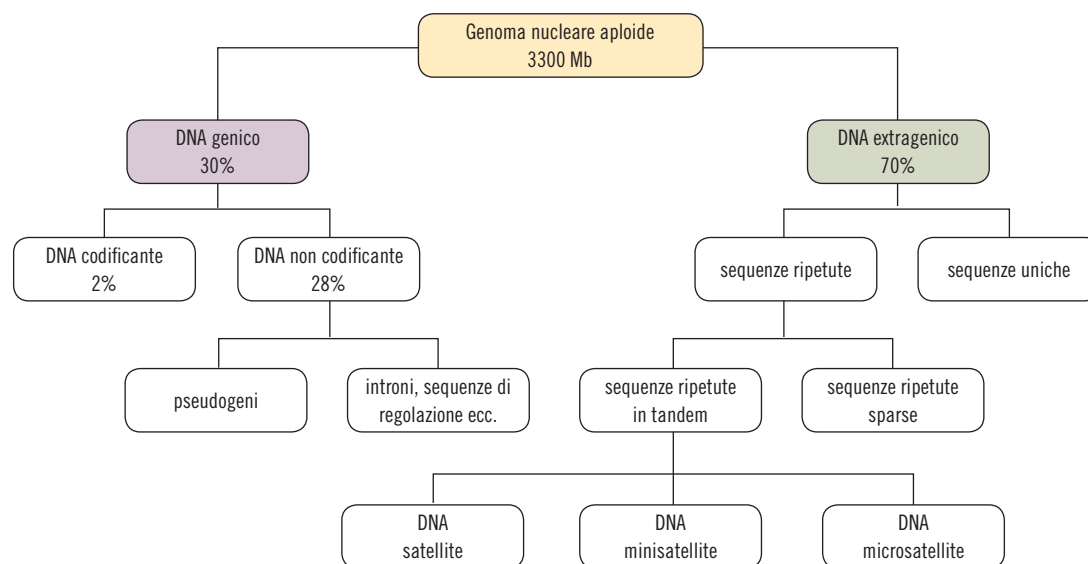



Figura 1.3
Distribuzione nel cromosoma delle diverse classi di DNA ripetitivo.

Lungo i bracci dei cromosomi si localizza una frazione particolare del DNA ripetitivo, quella dei cosiddetti microsatelliti (monomeri di 1-5 paia di basi ripetuti 10-30 volte) detti anche **STR** (**Short Tandem Repeats**). Gli STR presentano un elevato grado di polimorfismo all'interno della popolazione umana, in quanto il numero di ripetizioni all'interno di uno specifico sito (*locus*) può essere diverso da individuo a individuo. Questo tipo di polimorfismo è un polimorfismo di lunghezza: i diversi alleli, cioè, differiscono per il numero di ripetizioni e, quindi, hanno lunghezze diverse (fig. 1.4).

Figura 1.2
Organizzazione del genoma umano.

Per saperne di più

LA DATTILOSCOPIA E IL PROTOCOLLO CODIS

Figura 1.5
Impronta digitale inserita nella banca dati AFIS.

La dattiloscopia è la scienza che studia le creste cutanee papillari, principalmente dei polpastrelli delle dita, per stabilire l'identificazione personale. I disegni papillari, infatti, non si alterano durante la vita di un individuo, ma rimangono immutati dal momento della loro formazione, che avviene intorno al terzo mese di vita intrauterina; solo in caso di eventi traumatici (ad esempio l'asportazione in profondità del derma), o a seguito di particolari malattie infettive della pelle, le impronte digitali possono alterarsi. Per il riconoscimento e l'attribuzione di una impronta a un determinato individuo sono presi in considerazione punti particolari sulle creste papillari che, nel confronto, devono coincidere perfettamente. Secondo la Corte di Cassazione, due impronte appartengono alla medesima persona se hanno in comune 16-17 punti: è stato calcolato che, in questa condizione, la probabilità di errore, cioè che l'impronta appartenga a una persona diversa da quella che l'ha depositata, è di uno su 10 miliardi (1 su 10^{10}). L'Interpol e molte polizie nazionali, tra cui quella italiana, hanno accesso alle banche dati in cui è raccolta un'enorme e crescente quantità di impronte e sono in grado di effettuare in tempo reale comparazioni veloci e probanti. L'AFIS (Automated Fingerprint Identification System) è un sistema hardware e software che nasce dalla necessità di ridurre i normali tempi di acquisizione, catalogazione e confronto delle impronte; esso è consultabile da tutte le nazioni, compresa l'Italia (fig. 1.5).
Anche per l'impronta genetica si ricorre all'individuazione di più sequenze di microsatelliti. Secondo un protocollo (CODIS, Combined DNA Index System) stabilito dall'FBI e universalmente riconosciuto valido, vengono prese in considerazione 13 sequenze microsatelliti di cromosomi autosomici e 1 sequenza all'interno di un gene presente sui cromosomi sessuali per stabilire il sesso dell'individuo da cui proviene il materiale biologico (fig. 1.6). Seguendo questa procedura si ha la probabilità di uno su un milione di miliardi (1 su 10^{15}) che lo stesso DNA appartenga a due individui contemporaneamente. La distinzione fra gemelli monovulari, che hanno lo stesso DNA e sono quindi indistinguibili con il fingerprinting, è possibile solo in base alle diverse impronte digitali.

Allele 1

| CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA |

Allele 2

| CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA |

Allele 3

| CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA | CA |

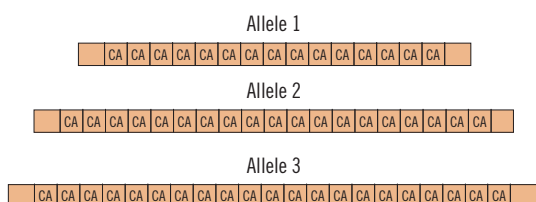



Figura 1.4
In questo esempio la ripetizione CA (citosina, adenina) presente in un particolare *locus* cromosomico ha tre forme alleliche di 15, 19 e 21 ripetizioni.

Il polimorfismo del DNA

Due genomi umani differiscono, in media, tra loro di circa 1 base ogni 500-1200 paia di basi (**SNP**, **Single Nucleotide Polymorphism**). Ognuno di noi è quindi un "unicum". Questa variabilità è distribuita sia nella parte codificante del genoma che nella parte non codificante (genica ed extragenica).
La variabilità genetica è introdotta dalle mutazioni che generano nuovi alleli (forme alternative di uno stesso gene) nelle popolazioni. Un gene con più alleli nella popolazione è detto **polimorfico**. Per alcuni geni il numero di alleli identificati può raggiungere le centinaia. Ricordiamo che tutte le cellule somatiche di un singolo individuo sono diploidi, portano cioè 2 alleli di uno stesso gene, uno proveniente dal padre e uno dalla madre: l'individuo sarà **omozigote** se porta due alleli identici, **eterozigote** se porta due alleli diversi.
Si definiscono alleli sia le forme alternative dello stesso gene (ad esempio le varianti normali e patologiche del gene della β-globina umana) sia le 4 possibili forme di un SNP (una per ogni base azotata del DNA). Nel primo caso la diversità allelica può corrispondere a una diversità fenotipica (nel nostro esempio un individuo sano, eterozigote o affetto da una globinopatia associata a una variante patologica della catena β dell'emoglobina); nel secondo caso, se il SNP è in una sequenza non codificante, quella differenza fra due individui sarà riscontrabile solo a livello genotipico, ossia analizzando la sequenza del DNA.

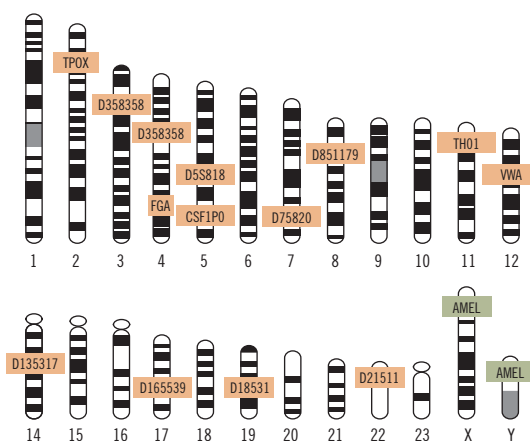



Figura 1.6
Schema del cariogramma umano con evidenziati i marcatori microsatelliti utilizzati dal sistema CODIS.

Nel caso dei polimorfismi di lunghezza del DNA micro e minisatellite, la diversità fra due individui si può mettere in evidenza “misurando” la lunghezza degli alleli in una determinata posizione (*locus*) cromosomica.
Come per tutti i *loci* genetici, anche per i microsatelliti i singoli individui possono essere omozigoti o eterozigoti; se un individuo è omozigote per il *locus* analizzato, sui due cromosomi omologhi è presente lo stesso numero di ripetizioni. Se invece un individuo è eterozigote, sui due cromosomi omologhi il numero di ripetizioni è diverso (fig. 1.7).
L’esistenza di questi *loci* genetici un po’ peculiari si può comprendere in base al meccanismo con cui le ripetizioni vengono generate, ossia per uno scivolamento della “macchina” enzimatica coinvolta nella replicazione del DNA (fig. 1.10).
Come accennato precedentemente, (vedi box “Per saperne di più” a p. 3) l’FBI ha stabilito un protocollo basato sull’analisi di 17 microsatelliti su cromosomi autosomici e di 1 sequenza parziale nel gene dell’amelogenina sui cromosomi sessuali (di lunghezza diversa sul cromosoma X e Y) per l’identificazione del sesso del campione biologico.
Un esempio di calcolo della frequenza nella popolazione di 4 *loci* microsatelliti è illustrato nella tabella seguente:

Individuo A

3 ripetizioni 5 ripetizioni

3 ripetizioni 4 ripetizioni

Individuo B

2 ripetizioni 7 ripetizioni

3 ripetizioni 6 ripetizioni

Figura 1.7
Esempio di microsatelliti presenti sulla coppia del cromosoma 2 degli individui A e B. L’individuo A è omozigote per il microsatellite TPOX e eterozigote per il microsatellite D2S1338; l’individuo B è eterozigote per entrambi i microsatelliti considerati.

Domande e risposte

QUALI SONO LE CARATTERISTICHE CHE RENDONO I MICROSATELLITI PARTICOLARMENTE UTILI PER L’IDENTIFICAZIONE PERSONALE?

- Il blocco di ripetizioni di una certa sequenza, presente in un dato punto del genoma, può essere costituito da numeri di ripetizioni diverse dando origine a numerosi alleli.
- I microsatelliti sono presenti in molti punti diversi del genoma con una densità media stimata intorno a 1 ogni 10 000 - 30 000 pb.
- I microsatelliti sono *loci* genetici altamente polimorfici e costituiscono, quindi, degli ottimi marcatori genetici. Studi di genetica di popolazioni hanno consentito di determinare la distribuzione delle frequenze dei diversi alleli in varie popolazioni e, quindi, di identificare i *loci* più adatti, in quanto più informativi, per essere utilizzati nel DNA fingerprinting.

TABELLA 1.1

LOCUS	ALLELE (N° ripetizioni)	FREQUENZA NELLA POPOLAZIONE	FREQUENZA COMBINATA
CSF1PO	1(7)	1 su 25 (0,040)	
TPOX	2(7)	1 su 100 (0,010)	allele 1x2 = 1 su 2 500
vWA	3(11)	1 su 320 (0,0031)	allele 1x2x3 = 1 su 800 000
D5S818	4(9)	1 su 75 (0,0133)	allele 1x2x3x4 = 1 su 60 000 000

Per eseguire un fingerprinting del DNA, le sequenze alleliche presenti in un dato *locus* vengono amplificate per mezzo della PCR utilizzando due primer complementari a sequenze uniche fiancheggianti il microsatellite.
I frammenti ottenuti sono successivamente analizzati per elettroforesi su gel di agarosio: i frammenti più corti migreranno più velocemente di quelli più lunghi, generando un profilo di bande simile a un codice a barre, caratteristico per ciascun individuo (fig. 1.8).
La procedura standard per la costruzione di un profilo genetico consiste in una “PCR multipla”

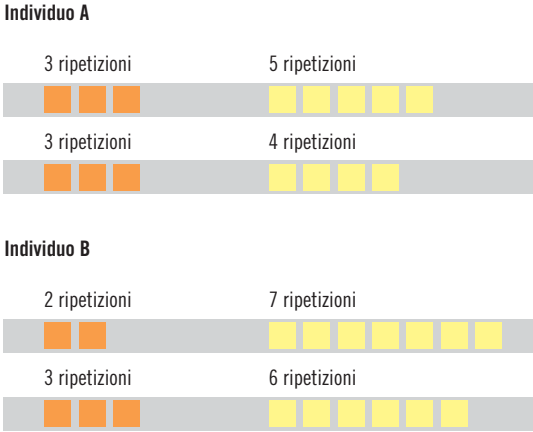
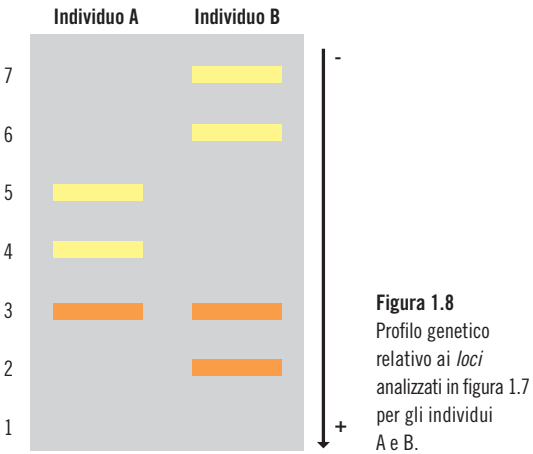
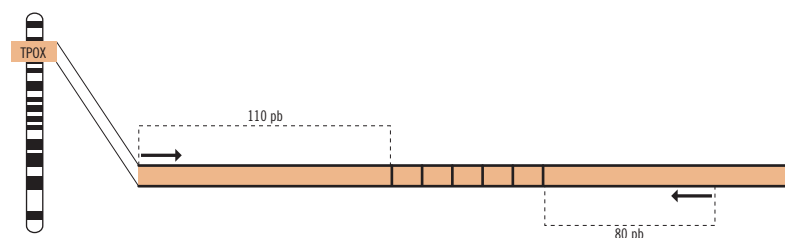
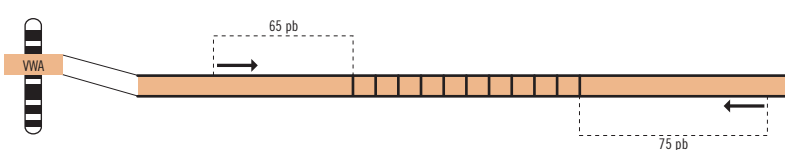



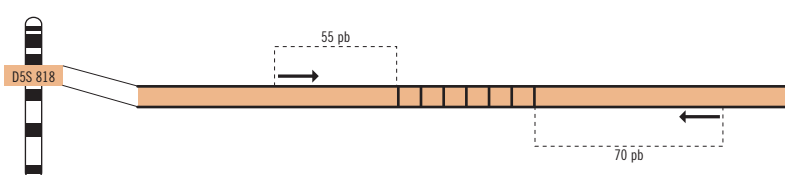
Figura 1.8
Profilo genetico relativo ai *loci* analizzati in figura 1.7 per gli individui A e B.

che utilizza contemporaneamente più coppie di primer specifiche per i *loci* microsatelliti che si vogliono analizzare. La figura 1.9 illustra lo schema di amplificazione di 3 *loci* microsatelliti. Si noti la posizione dei primer.
Per garantire la specificità di una PCR, i primer devono essere disegnati a livello di sequenze uniche nel genoma, in modo che possano appaiarsi al DNA solo nella zona di interesse. La lunghezza e il contenuto in basi (espresso come % di GC, guanina e citosina) dei primer di una coppia devono essere comparabili, per garantire la stessa efficienza di amplificazione nei due sensi di sintesi.
Software dedicati identificano sequenze fiancheggianti la regione di interesse che possiedono queste caratteristiche.

***Locus* TPOX**
unità di ripetizione: 4 pb
n° di alleli più frequentemente osservati nella popolazione: 8

TPOX
110 pb
80 pb

***Locus* vWA**
unità di ripetizione: 4 pb
n° di alleli più frequentemente osservati nella popolazione: 11

VWA
65 pb
75 pb

***Locus* D5S818**
unità di ripetizione : 4 pb
n° di alleli più frequentemente osservati nella popolazione: 10

D5S 818
55 pb
70 pb

Figura 1.9
Esempio di amplificazione di 3 *loci* microsatelliti (pb = paia di basi). Le frecce indicano le posizioni e la direzione di amplificazione dei primer; ogni rettangolino rappresenta una unità di ripetizione del microsatellite.

Per saperne di più

LE MALATTIE DA ESPANSIONE DI TRIPLETTE

Le ripetizioni in tandem di trinucleotidi possono essere presenti anche all'interno di sequenze codificanti e sono siti soggetti a espansione patologica. L'amplificazione della sequenza è dovuta a uno scivolamento del macchinario enzimatico durante la replicazione del DNA (fig. 1.10).
L'alterazione patologica riguarda in genere uno solo dei due alleli di un determinato gene.
Nella sindrome dell'X fragile (la forma ereditaria più frequente di ritardo mentale) la mutazione riguarda il gene FMR1 (sul cromosoma X), che codifica per una proteina implicata nello sviluppo delle sinapsi.
La Corea di Huntington è una patologia neurodegenerativa associata all'espansione della tripletta CAG nel gene della huntingtina (sul cromosoma 4), una proteina che è espressa in neuroni localizzati in specifiche aree del cervello.
Nel caso della distrofia miotonica la proteina coinvolta è espressa nel muscolo ed è fondamentale per la sua funzionalità.
In queste patologie si osserva una correlazione tra il numero delle ripetizioni, l'età di insorgenza della malattia e la gravità dei sintomi.

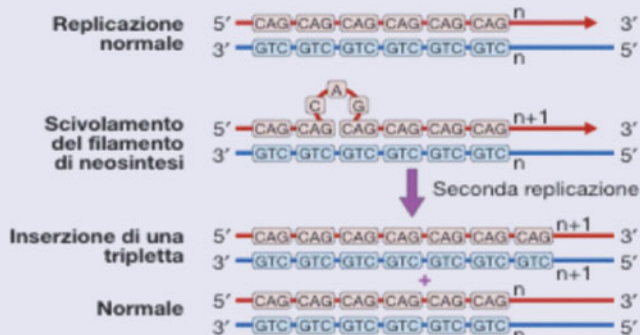



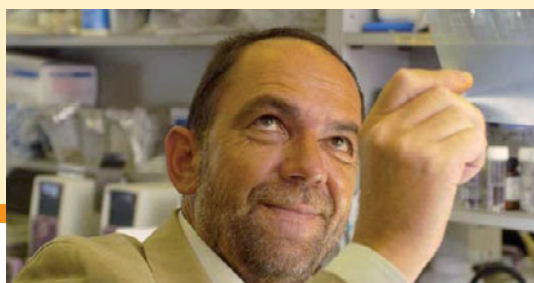
Figura 1.10
Scivolamento del macchinario enzimatico con formazione di una serie di triplette ripetute.

Alcune mutazioni dovute ad espansione di trinucleotidi

Sindrome	tripletta ripetuta	localizzazione del gene	n° di ripetizioni normali	n° di ripetizioni nella malattia	Numero OMIM
X Fragile	CGG	Cr X	da 5 a 52	da 230 a 72 000	309550
Corea di Huntington	CAG	Cr 4	da 6 a 37	da 35 a 121	143100
Distrofia miotonica	CTG	Cr 19	da 5 a 37	da 50 a 72 000	160900

Storia della scienza

Alec Jeffrey e la sua scoperta

Alec Jeffrey nasce nel 1950 a Oxford e fin da piccolo ha la passione per le scienze; si laurea in Biochimica nel 1972 e prosegue gli studi con un dottorato in Genetica. Con il collega Richard Flavell, ad Amsterdam, scopre l'esistenza nel genoma nucleare degli introni studiando il gene della β-globina di coniglio, scoperta che sfata l'opinione diffusa a quell'epoca che il genoma sia una serie ininterrotta di geni. La sua ricerca, tuttavia, non continua sugli introni, ma si concentra sull'individuazione nel genoma di "pezzi" di DNA caratteristici e unici in ogni organismo vivente.
La scoperta avviene la mattina del 10 settembre 1984: quel giorno Jeffrey ottenne il suo primo successo con il fingerprinting del DNA, confrontando il DNA di suoi colleghi e di alcuni familiari e riconoscendo attraverso il confronto tra le bande chi era imparentato e chi no.
Il DNA utilizzato era stato tagliato con gli enzimi di restrizione, ottenendo quindi numerosi frammenti di diversa lunghezza. Tra tutti questi, solo alcuni potevano associarsi (ibridare) con una sonda radioattiva di DNA ripetitivo minisatellite. Esponendo su una lastra per raggi X i frammenti di DNA separati tramite elettroforesi e ibridati alla sonda radioattiva, Jeffrey osservò dei segnali che erano caratteristici di ogni individuo, ottenendo il primo fingerprinting del DNA.

Alec Jeffrey con la lastra fotografica risultato del suo primo esperimento di fingerprinting del DNA.

Attribuzione di paternità attraverso il fingerprinting del DNA

I microsatelliti sono trasmessi come caratteri mendeliani semplici codominanti. Gli alleli ai diversi *loci* segregano indipendentemente e si ritrovano nei gameti in tutte le combinazioni possibili. Consideriamo, per semplicità, la trasmissione degli alleli di un singolo locus microsatellite in due generazioni (fig. 1.11).
Ogni individuo eredita 50% degli alleli (bande) dal padre e 50% dalla madre. Tutte le bande del profilo genetico del figlio devono essere rintracciabili o nell'impronta materna o in quella paterna. Un esempio in cui il DNA fingerprinting permette di risolvere facilmente un caso di paternità dubbia è illustrato in figura 1.12. Il padre 1 è il padre biologico.

Figura 1.11
Trasmissione degli alleli di 1 microsatellite in un albero genealogico che rappresenta tre generazioni; il quadrato indica il maschio e il cerchio la femmina. All'interno dei simboli sono indicati gli alleli del microsatellite. Nella parte inferiore è riportato il profilo genetico di ciascun individuo per il *locus* analizzato, determinato mediante elettroforesi.

Elettroforesi capillare

Nei laboratori specializzati, per potere distinguere i prodotti di amplificazione dei singoli microsatelliti, si utilizzano per l'amplificazione primer legati a molecole fluorescenti (**fluorocromi**) che emettono colori differenti. Per ovvie ragioni, a una stessa molecola fluorescente vengono legati primer che amplificano regioni di diversa dimen-

sione e che, quindi, non si sovrappongono nel profilo. La ragione dell'uso di primer fluorescenti è legata al fatto che l'analisi degli amplificati viene eseguita con un sistema di elettroforesi capillare (fig. 1.13) che consente di distinguere i frammenti di DNA amplificati sulla base del colore.

I frammenti vengono separati per elettroforesi in un capillare che contiene una soluzione polimerizzante. Nella parte inferiore, il capillare è dotato di una finestra attraverso la quale il laser eccita, a una precisa lunghezza d'onda, i frammenti di DNA marcati con i diversi fluorocromi e ne permette l'identificazione (fig. 1.13a).

Ogni frammento, identificato da una lunghezza (che dipende dal numero di ripetizioni) e da un colore (che dipende dal fluorocromo dei primer che lo hanno amplificato), viene rappresentato da un picco e attribuito a un microsatellite (fig. 1.13b): **elettroferogramma**.

I risultati dell'elettroforesi capillare vanno elaborati, eliminando eventuali sovrapposizioni tra gli spettri di emissione e, soprattutto, convertendo l'informazione contenuta nei vari picchi (lunghezza e numero dei frammenti di DNA) in un linguaggio comune che permetta di confrontare i dati di laboratori diversi. La conversione dell'elettroferogramma in profilo genetico è oggi effettuata tramite *software* disponibili in commercio. I profili devono, poi, essere interpretati da operatori esperti, in modo da individuare possibili errori causati, ad esempio, da fattori legati alla scarsa quantità del DNA esaminato, dalla sua degradazione o dalla presenza di profili misti (cioè dal fatto che è stata analizzata una traccia in cui era presente materiale biologico appartenente a due o più soggetti).

Effettuati questi controlli, il profilo ottenuto rappresenta l'impronta genetica di un determinato individuo.

Figura 1.12
Risultato di un'analisi *multiloci* per la determinazione della paternità. Il padre 1 è il padre biologico.

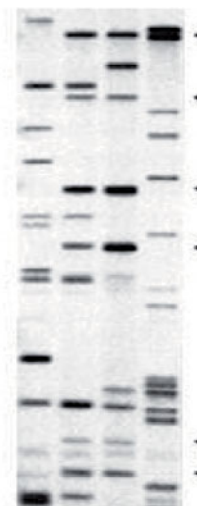



Figura 1.13
Schema dell'elettroforesi capillare.

Iniezione del campione

Miscela dei campioni di DNA marcati con fluorocromi e amplificati con PCR Multipla

Separazione dei campioni su capillare

LASER (488 nm)

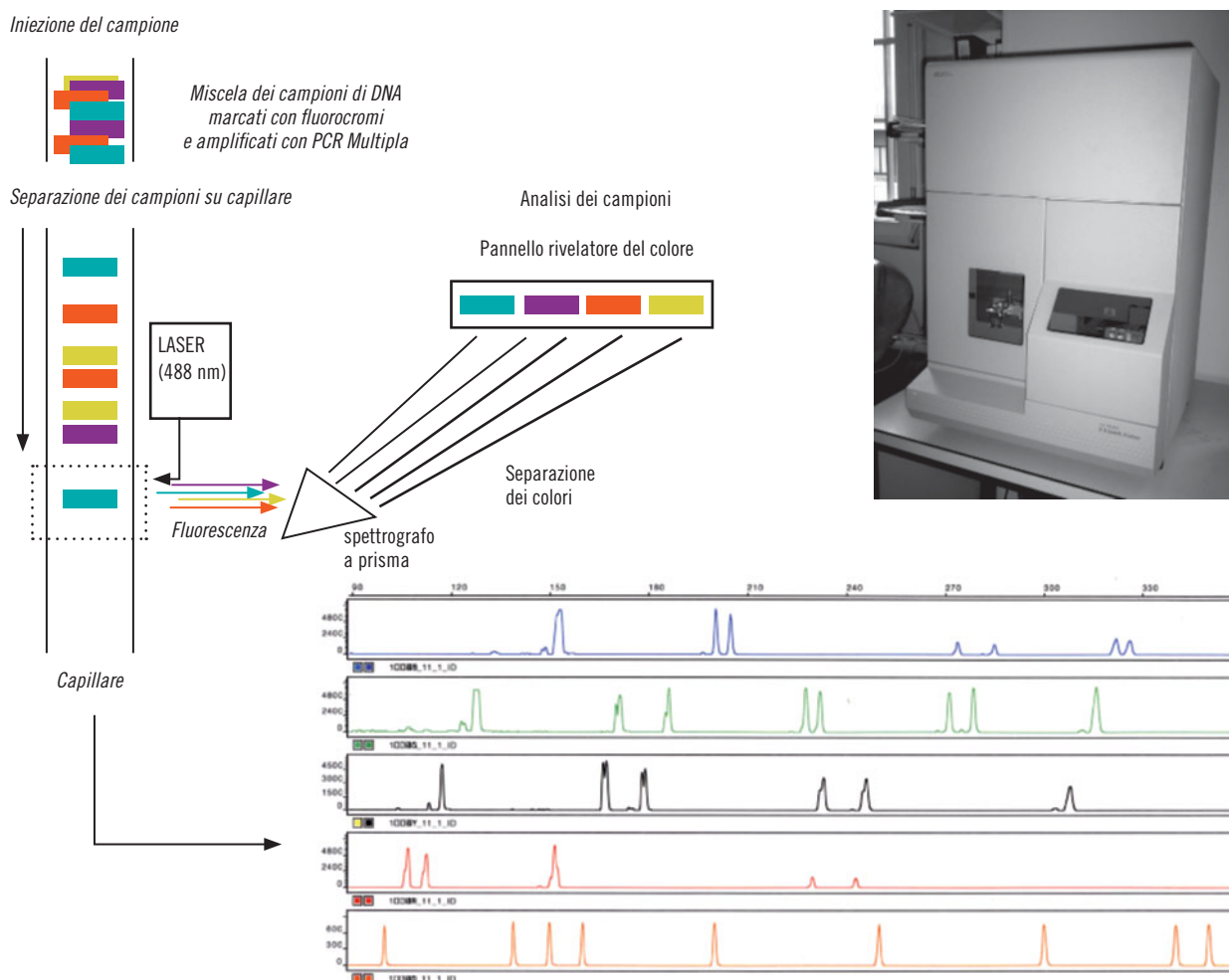
Fluorescenza

spettrografo a prisma

Separazione dei colori

Analisi dei campioni

Pannello rivelatore del colore

Capillare

La scena del crimine

Nel laboratorio di una grande casa farmaceutica tedesca la dott.ssa Christine Kritt viene trovata dalla donna delle pulizie la mattina presto ancora nel suo studio, apparentemente addormentata. Inizialmente la donna non si preoccupa, perché spesso capita che la dottoressa rimanga a lavorare tutta notte, ma questa volta c'è qualcosa di strano. I cassetti della scrivania sono aperti, ci sono fogli sparsi sul pavimento, la stampante accesa e collegata al computer continua a lampeggiare per indicare l'inceppamento della carta. A questo punto la donna prova a chiamare la dottoressa, che però non si muove e sembra svenuta o... peggio!
Viene chiamata immediatamente la polizia e il medico che soccorre la dottoressa constata solo una contusione alla testa causata da un colpo inferto dall'aggressore, probabilmente utilizzando come arma l'estintore ritrovato a terra vicino alla scrivania. Christine Kritt si riprende e racconta di aver subito un'aggressione mentre stava per archiviare sul computer la formula per un farmaco rivoluzionario da lei inventato e sperimentato: efficace e senza effetti collaterali per l'eliminazione totale dell'ipertricosi!!!
Da un controllo veloce scopre che la formula scritta sui suoi quaderni di laboratorio è scomparsa, così come il file che stava archiviando ma che non era ancora protetto da password! C'era anche una busta sigillata con la formula dentro... anche la busta è stata aperta ed è vuota, ma incollato al bordo richiudibile della busta la polizia individua un capello.

I sospettati sono:
• la collega di laboratorio Isabell Gralitziu, che da anni lavorava su quella formula, ma senza successo a causa della sua avversione per le colture batteriche di *Escherichia coli*, che sono indispensabili per ottenere il farmaco;
• il tecnico di laboratorio Robert Battle, costretto a fare gli straordinari per mesi e mesi senza alcuna retribuzione aggiuntiva;
• lo studente laureando Lorentz Cats, affabile e zelante, ma disperatamente alla ricerca di un finanziamento per andare negli Stati Uniti per un dottorato di ricerca.

La polizia scientifica rileva le impronte digitali sull'estintore e preleva i campioni biologici per procedere all'analisi del DNA. Si ha a disposizione il DNA di:
1. Dott.ssa Christine Kritt (V)
2. scena del crimine, cioè il DNA estratto dal bulbo del capello (SC)
3. Dott.ssa Isabell Gralitziu (S1)
4. Robert Battle (S2)
5. Lorentz Cats (S3)

L'esperimento

Per eseguire l'esperimento scaricate le schede del protocollo di laboratorio che riguardano la preparazione del gel di agarosio e la corsa elettroforetica.
Ogni provetta contiene i prodotti di PCR multipla per i tre microsatelliti della figura 1.9.
Le provette sono identificate nel seguente modo:
PM = marcatori di peso molecolare;
V = vittima;
SC = scena del crimine;
S1 = sospettato 1;
S2 = sospettato 2;
S3 = sospettato 3;
C = bianco di PCR.

Chi è il colpevole? Analisi dei risultati

Il risultato dell'esperimento viene riportato nello schema sottostante (fig. 1.14).

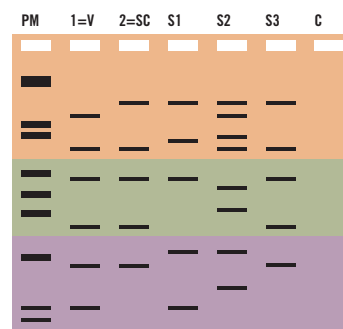



Figura 1.14 Schema del risultato del gel dell'esperimento: le tre aree colorate corrispondono ai tre microsatelliti analizzati.

Interpretazione

La foto del gel va osservata attentamente per stabilire quale indiziato ha lo stesso profilo del DNA di quello prelevato dalla scena del crimine. Per avere la certezza è necessario che le bande dell'indiziato coincidano tutte perfettamente con quelle del campione prelevato sulla scena del crimine. Nel nostro caso questo accade per l'indiziato S3.
Attenzione: in Genetica una rondine non fa primavera, ma neanche due! In altri termini, per poter fare il profilo di un individuo ed ottenere risultati attendibili, bisogna analizzare almeno 17 microsatelliti. Nel nostro esperimento abbiamo analizzato 3 microsatelliti, e non 17, per motivi di tempo, di spazio e di costi.

2. Identificazione degli OGM

L'esperimento illustrato spiega come è possibile stabilire se una pianta è stata geneticamente modificata mediante l'inserimento di un gene estraneo o transgene.

La presenza del transgene può essere rilevata analizzando il DNA estratto dalla pianta. Nell'esperimento descritto si verificherà la presenza, in campioni di mais, del gene Bt, un gene proveniente dal batterio Bacillus thuringensis*, che conferisce alla pianta la capacità di produrre una proteina che la rende resistente ad alcuni insetti infestanti.*

Che cos'è un organismo geneticamente modificato (OGM)?

Osservando la pianta di mais rappresentata in figura 2.1, è possibile determinare se è stata geneticamente modificata? Alla pura osservazione, una pianta geneticamente modificata (GM) ha lo stesso aspetto di una pianta non GM. Ciò che le distingue è una modificazione introdotta nel DNA utilizzando alcune moderne tecniche biotecnologiche.

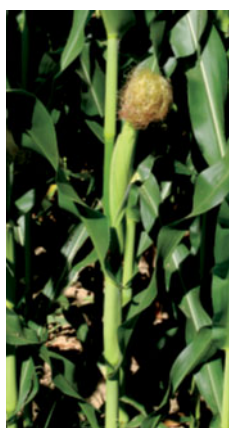



Figura 2.1
Particolare di una pianta di mais, il cui nome botanico è *Zea mais.*

La direttiva dell'Unione Europea 2001/18/CE definisce OGM "un organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale". La direttiva specifica le tecniche utilizzate per ottenere tale modificazione del materiale genetico: in pratica, sono considerati geneticamente modificati gli esseri viventi il cui DNA è stato modificato attraverso **tecniche di ingegneria genetica**, che permettono l'isolamento, la modifica e il trasferimento da un organismo a un altro di sequenze di DNA. Non sono invece considerati OGM gli organismi ottenuti mediante "fecondazione in vitro, processi naturali quali la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione, l'induzione della poliploidia" e quelli ottenuti con programmi di miglioramento genetico convenzionale, inclusa "la mutagenesi e la fusione cellulare di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali".
È quindi grazie all'ingegneria genetica che il mondo scientifico è approdato agli OGM. OGM

Conoscenze propedeutiche

- La struttura del DNA e il codice genetico
- Il genotipo e il fenotipo
- Gli enzimi di restrizione
- I vettori di clonaggio e la trasformazione

Figura 2.2
Confronto tra i frutti del teosinte (a destra) e del mais

possono essere virus, batteri, funghi, piante o animali: questo è possibile grazie all'**universalità del codice genetico**, al fatto cioè che tutti gli esseri viventi, dal punto di vista genetico, parlano la stessa lingua. Un gene umano introdotto in una cellula batterica o un gene batterico introdotto in una cellula vegetale faranno sintetizzare nella cellula ricevente la stessa proteina prodotta nella cellula donatrice.
Per essere certi che un organismo sia geneticamente modificato bisogna ricercare nel suo DNA la presenza di un gene estraneo (**transgene**) che rende l'organismo ospite in grado di esprimere un nuovo carattere, non tipico della specie di appartenenza.

La selezione di piante per l'agricoltura

In figura 2.2 sono rappresentate una pianta di teosinte e una di mais. Che cosa hanno in comune? Nonostante le loro spighe abbiano dimensioni molto diverse, queste piante sono tra loro strettamente imparentate. Il **teosinte** è una pianta annuale simile al mais sia nell'aspetto che nel genotipo: infatti ha anch'esso 20 cromosomi, analogamente alla specie coltivata. Molto probabilmente il mais è stato ottenuto a partire dalla pianta di teosinte, che ne rappresenta pertanto l'antenato selvatico.
Come può essere avvenuta una simile trasformazione? La manipolazione delle piante non è soltanto quella dell'ingegneria genetica, ma risale alla nascita dell'agricoltura. Già nell'antichità si selezionavano attraverso incroci programmati le specie più adatte, quelle più resistenti e/o quelle che davano i migliori raccolti. A partire da 10 000

Per saperne di più

IL MAIS BT

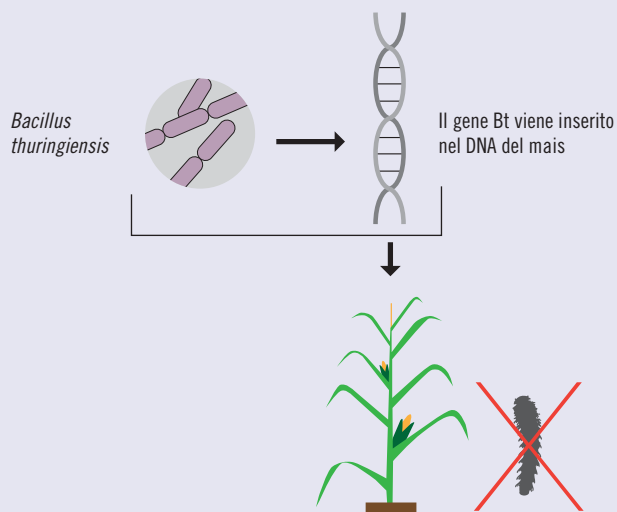



Figura 2.3
La proteina Cry prodotta dal gene Bt protegge la pianta di mais nei confronti di insetti dannosi.

Il **mais Bt** è una varietà di mais resistente agli insetti. La resistenza è ottenuta facendo produrre alla pianta una proteina tossica per gli insetti prodotta da *Bacillus thuringiensis*, un batterio del terreno utilizzato anche nell'agricoltura biologica come insetticida naturale. Questo microrganismo possiede un gene (Bt) che codifica per la proteina Cry (così chiamata perché si presenta in forma cristallina), che è in grado di legarsi selettivamente a specifici recettori localizzati nell'epitelio intestinale delle larve di alcune specie di insetti (tra cui la piralide, un insetto dannosissimo per le colture). Il legame della proteina con i recettori provoca la distruzione dell'epitelio intestinale. Esistono diversi tipi di proteine Cry, prodotte da differenti sottospecie di *Bacillus thuringiensis,* che hanno una elevata specificità di azione nei confronti di vari tipi di insetti. I mammiferi non hanno recettori per le proteine Cry.
Per conferire a una specie vegetale il carattere di resistenza nei confronti di un particolare tipo di insetto è sufficiente introdurre nel suo genoma il gene che codifica per la proteina Cry attiva contro quell'insetto (fig. 2.3). In tal modo la pianta sarà in grado di produrre questa proteina, che esplicherà la sua azione insetticida quando l'insetto si ciba dei suoi tessuti.
Il mais Bt sembra presentare vantaggi anche riguardo a un altro problema che preoccupa gli agronomi. Nel mais sono spesso presenti tossine (aflatossine) dovute all'infezione da parte di muffe. Le aflatossine hanno tossicità acuta e cronica e attività cancerogena su animali e uomo. Utilizzare mais geneticamente modificato resistente alla piralide, insetto le cui larve trasportano spore fungine e scavano gallerie nello stocco e nella spiga del mais, favorendo quindi le infezioni fungine, potrebbe risolvere questo problema. La coltivazione su larga scala di mais, cotone e patate con geni Bt è iniziata nel 1997 in Australia, Argentina e Canada. La tossina prodotta dal gene Bt è stata sperimentata anche su pioppo, melanzana, tabacco e soia.

anni fa, con incroci controllati, cioè selezionando gli organismi parentali e cercando di "fissare" dei caratteri desiderabili, sono state ottenute diverse varietà di mais, ma anche di riso, orzo, grano, lenticchie, peperoni, arachidi, zucca.
Dal secolo scorso nuove varietà vegetali per l'agricoltura sono state ottenute inducendo mutazioni, tramite irraggiamento con radiazioni ionizzanti o con agenti chimici, e si sono incrociate anche specie diverse ottenendo ibridi fertili: ne è un esempio il **triticale**, incrocio tra il grano duro e la segale (fig. 2.4).
Tuttavia le normali tecniche di selezione danno esiti casuali e la maggior parte delle varianti ottenute sono piantine aberranti e inutilizzabili. Solo poche piante, dopo numerose e attente selezioni, risultano essere utili; non si ha, però, la possibilità di sapere con precisione cosa sia successo dal punto di vista genetico.
La creazione di modificazioni genetiche mirate attraverso le biotecnologie moderne permette di operare in maniera estremamente precisa. Quello che si fa è, infatti, di aggiungere al patrimonio genetico di una pianta una precisa sequenza di DNA, proveniente anche da specie non sessualmente compatibili. Dal punto di vista tecnologico questo rappresenta sicuramente un passaggio di qualità rispetto alle normali tecniche di selezione, sia per la probabilità di ottenere dei successi che per la possibilità di conoscere con precisione ciò che è stato introdotto ed eventualmente modificato.

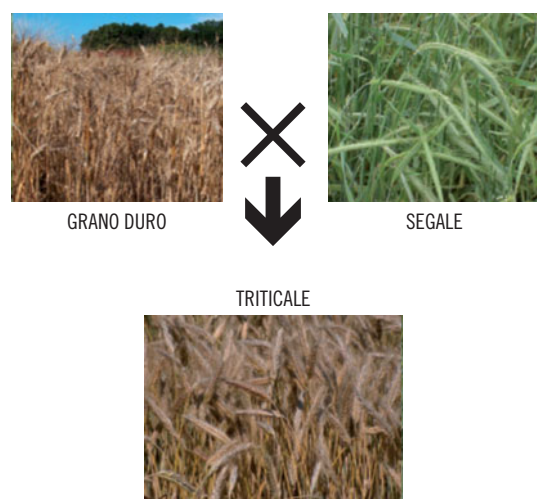



Figura 2.4
Il triticale è un cereale ottenuto dall'incrocio tra due specie distinte: il grano duro e la segale.

Come si fa a modificare geneticamente una pianta?

La **tecnica del DNA ricombinante** rappresenta il passaggio fondamentale per modificare un organismo e, quindi, anche una pianta. Vediamo ora più in dettaglio le tre tappe principali:

1. isolamento del gene esogeno e preparazione del vettore;
2. trasferimento del gene esogeno alla pianta ospite;
3. identificazione e sviluppo della pianta geneticamente modificata.

1. Isolamento del gene esogeno e preparazione del vettore

Innanzitutto, è necessario stabilire quale gene si vuole inserire nell'organismo ospite. Una volta individuato, il gene in questione può essere isolato in uno dei seguenti modi:

- estrazione, da cellule o tessuti opportuni, di mRNA (RNA messaggero) che codifica per la proteina di interesse; in seguito, grazie all'azione della trascrittasi inversa, si procede alla sintesi del DNA complementare (cDNA), risalendo così alla copia di DNA che contiene l'informazione genetica che stiamo cercando;
- isolamento del gene direttamente da DNA genomico dell'organismo in cui è presente e sua successiva purificazione. Questa tecnica è più complessa, ma resa possibile grazie all'impiego degli enzimi di restrizione.
- sintesi artificiale di un gene di cui sia nota la sequenza: si utilizza una particolare "macchina dei geni" (sintetizzatore di sequenze nucleotidiche) in grado di produrre la sequenza di nucleotidi desiderata;

Il gene esogeno deve essere preceduto da regioni di controllo specifiche, come il **promotore**, per consentire l'espressione nell'organismo ospite.
Il gene così allestito deve essere introdotto in un **vettore**, cioè una molecola di DNA in grado di replicarsi nella cellula ospite prescelta. Frequentemente si utilizzano **plasmidi**, molecole di DNA circolari extracromosomiche presenti naturalmente nei batteri e capaci di replicarsi autonomamente all'interno della cellula batterica.
Si usano per lo più plasmidi modificati geneticamente in laboratorio (fig. 2.5), in cui sono stati eliminati praticamente tutti i geni originali e che contengono:

- un'origine di replicazione del DNA (*ori*, da "origine"), che permette ai plasmidi di replicarsi in modo indipendente dal cromosoma della cellula ospite;

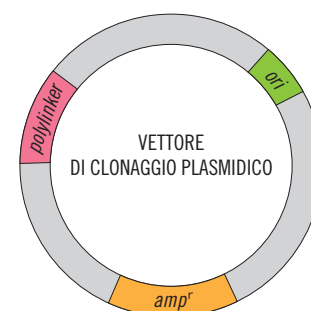



Figura 2.5
Esempio di plasmide.
ori: origine di replicazione del DNA; *amp*^{r}: gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina; (polylinker) sito di clonaggio contenente siti di taglio per diversi enzimi di restrizione.

Figura 2.6
Nella figura è mostrato lo strumento con cui si "sparano" i microproiettili rivestiti da DNA per farli entrare nelle cellule vegetali.

- un gene marcatore, che permette di riconoscere le cellule contenenti il plasmide da quelle che non lo contengono: in genere si tratta di un gene per la resistenza a un antibiotico, ad esempio il gene *amp*^{r} che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina;
- una regione, il sito di clonaggio, in cui possa essere inserito il segmento di DNA esogeno; questa zona, chiamata *polylinker* o zona di clonaggio multiplo, è costituita da un tratto di DNA che contiene delle sequenze uniche riconosciute come siti di taglio da parte di enzimi di restrizione (siti di restrizione).

Sia il plasmide che il DNA esogeno sono tagliati con lo stesso enzima di restrizione per generare estremità compatibili. Il plasmide ricombinante (plasmide con inserito il frammento di DNA esogeno) è ottenuto mediante ligazione ad opera dell'enzima DNA ligasi che forma legami fosfodiesterici per ripristinare la molecola circolare.

2. Trasferimento del gene esogeno alla pianta ospite

Completata la "costruzione" del vettore, quest'ultimo deve essere introdotto nella cellula vegetale prescelta.
Per le piante sono state realizzate alcune tecniche che favoriscono il trasferimento di geni e la loro integrazione stabile nel DNA della cellula e quindi la loro trasmissione alla progenie. Le più comuni sono quelle basate sull'utilizzo di sistemi fisico-chimici o di sistemi biologici come il trasferimento genico mediato da batteri.

Figura 2.7
Agrobacterium tumefaciens.

• *Tecniche che utilizzano sistemi fisico-chimici*

- *Metodo biolistico* (= biologia + balistica). Il tessuto vegetale è "bombardato" con microproiettili d'oro o di tungsteno del diametro di qualche μm ricoperti con il DNA del vettore in cui è stato integrato il gene di interesse (fig. 2.6). Una volta all'interno, il DNA si stacca dal supporto e si integra nel DNA della cellula stessa. Le lesioni prodotte dai microproiettili sono temporanee e di lieve entità. Il metodo biolistico è risultato particolarmente efficace nei confronti di alcune specie vegetali, ad esempio legumi e diverse specie arboree.
- *Metodo dell'elettroporazione* (o elettroperforazione) di protoplasti. Applicando un campo elettrico pulsante a tensione elevata si provoca la formazione di piccole aperture temporanee sulla membrana cellulare del protoplasto (cioè della cellula vegetale privata, enzimaticamente, della parete vegetale, in quanto questa rappresenta un ostacolo al passaggio di molecole), per favorire l'ingresso del vettore ricombinante nella cellula ospite. Successivamente il DNA esogeno si può integrare nel DNA della cellula ospite, diventando parte del suo patrimonio ereditario. La cellula rigenera quindi la parete cellulare e, coltivata in presenza di opportuni stimoli ormonali, dà luogo ad una pianta transgenica.

• *Tecniche che utilizzano sistemi biologici*

- *Trasferimento genico mediato da Agrobacterium tumefaciens* (Quando la natura ci precede…)

L'ingegneria genetica delle piante esiste già in natura. Al di fuori dell'intervento umano, esiste un organismo che, forse da milioni di anni, fa esattamente quanto l'uomo cerca di ottenere con le sofisticate tecniche del DNA ricombinante. Infatti *l'Agrobacterium tumefaciens* (fig. 2.7) è un comune batterio del suolo che riprogramma, a suo uso e consumo, l'informazione genetica delle cellule delle piante inserendo al loro interno geni estranei e inducendo l'espressione delle proteine corrispondenti. Il batterio aderisce alla superficie della pianta, in genere dove trova una lesione, soprattutto in corrispondenza della giunzione tra radice e fusto (colletto) o vicino a essa, costringendo le cellule vegetali circostanti a proliferare e a formare una galla o tumore (fig. 2.8). I tumori indotti da *A. tumefaciens* producono sostanze particolari chiamate opine (derivati di comuni composti intermedi del metabolismo, per la maggior parte aminoacidi, vari chetoacidi e zuccheri) utilizzate come cibo dall'*Agrobacterium*.

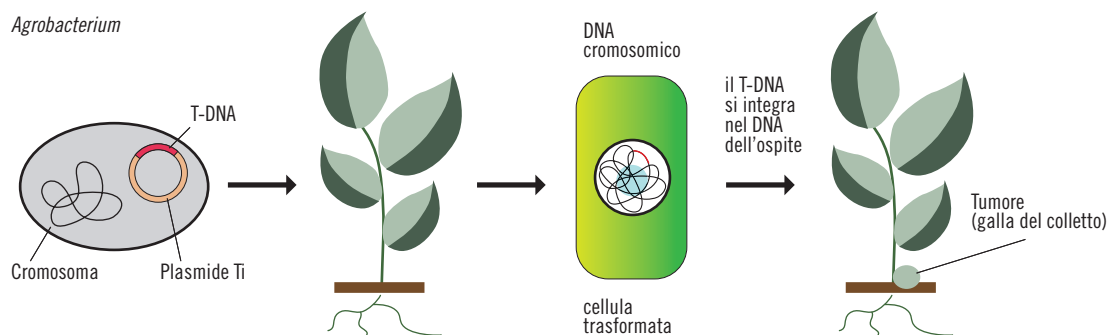



Figura 2.8
Infezione del batterio *Agrobacterium tumefaciens* e formazione di un tumore (galla). Il tumore è indotto dal plasmide Ti presente nel batterio che integra una parte del suo DNA (T-DNA) nei cromosomi della cellula vegetale.

Il batterio, quindi, è in grado di indurre la cellula vegetale a produrre una sostanza che la cellula vegetale non è in grado normalmente di fabbricare e di cui esso solo è capace di nutrirsi. Le cellule vegetali, inoltre, trasmettono questa capacità alle cellule figlie. Questo comportamento particolare è dovuto al fatto che il microrganismo, oltre al suo unico cromosoma, ospita normalmente un plasmide detto Ti (*Tumour inducing*), che è il vero responsabile della trasformazione delle cellule sane in cellule tumorali. All'atto dell'infezione, il batterio aderisce alle cellule della pianta e un segmento del plasmide Ti passa al loro interno. Questo frammento, che è stato denominato T-DNA, si inserisce nel DNA delle cellule infettate e da quel momento in poi diventa parte integrante del loro patrimonio genetico. *Agrobacterium*, essendo il solo in grado di nutrirsi delle opine, si è così creato, rispetto agli altri microrganismi del suolo, una nicchia ecologica, un modo particolare per risolvere la lotta per la sopravvivenza. Allo stesso tempo realizza un vero capolavoro di ingegneria genetica. In altre parole, il plasmide Ti è l'elemento centrale di una interazione ecologica estremamente evoluta.

OGM A COLORI

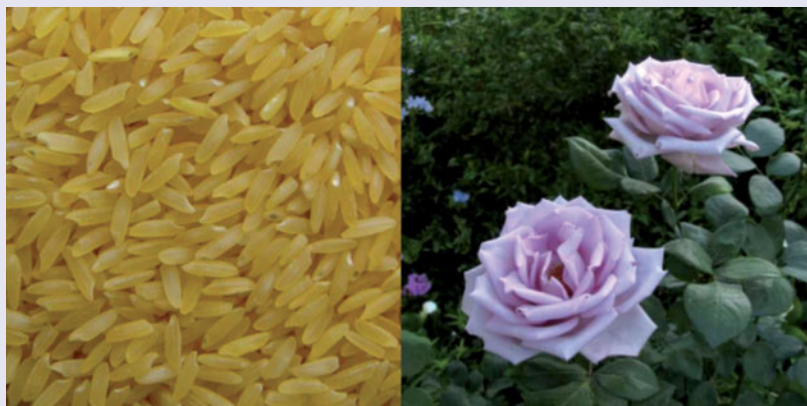
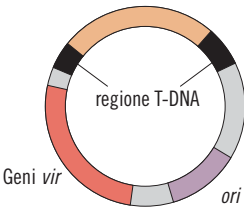
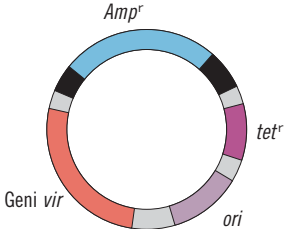
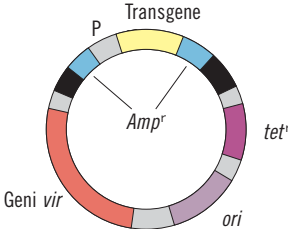



Figura 2.9
A sinistra il Golden Rice, dal colore giallo-dorato, e, a destra, la rosa blu geneticamente modificata.

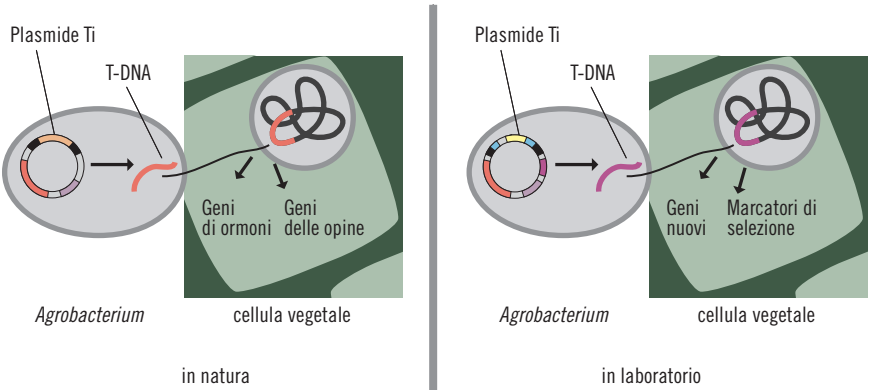
La principale coltura alimentare del mondo si tinge di giallo! È stata messa a punto una qualità di riso transgenico chiamata **Golden Rice**, riso dorato (fig. 2.9 a sinistra): il giallo dei chicchi è dovuto alla capacità della pianta di sintetizzare beta-carotene, il precursore della vitamina A, a cui si deve la colorazione. Tale caratteristica è stata ottenuta inserendo nel DNA del riso i geni di narciso responsabili della produzione di beta-carotene. In tal modo il riso, che normalmente non contiene vitamina A, può fornire questa sostanza, che è carente nell'alimentazione di molti paesi poveri.
Un altro esempio riguarda le rose: nessuna qualità di rosa è, infatti, in grado di produrre un pigmento blu e le rose blu in commercio sono ottenute grazie a coloranti immessi nel terreno di coltura o addirittura spruzzati sui petali. Una ricerca durata anni ha portato, invece, alla prima rosa in grado di produrre da sola un pigmento blu, la **delfinidina** (fig. 2.9 a destra). Il gene è stato ottenuto dalla petunia e poi inserito, mediante la tecnologia del DNA ricombinante, nel DNA della rosa.

Tabella. 2.1

PLASMIDE TI NATURALE	PLASMIDE TI VETTORE	PLASMIDE TI RICOMBINANTE
regione T-DNA; Geni *vir*; *ori*	*Amp*^{r}; *tet*^{r}; Geni *vir*; *ori*	Transgene; P; *Amp*^{r}; *tet*^{r}; Geni *vir*; *ori*
Un'origine di replicazione (*ori*)	Un'origine di replicazione (*ori*)	Un'origine di replicazione (*ori*)
Geni che conferiscono la virulenza all'*Agrobacterium (vir)*	Geni che conferiscono la virulenza all'*Agrobacterium (vir)*	Geni che conferiscono la virulenza all'*Agrobacterium (vir)*
La regione T-DNA, che entra nelle cellule e contiene geni per la sintesi e il catabolismo delle opine, per indurre il tumore e, alle due estremità, sequenze per il trasferimento e l'integrazione (in nero in figura)	Le due estremità della regione T per il trasferimento e l'integrazione (in nero in figura)	Le due estremità della regione T per il trasferimento e l'integrazione (in nero in figura)
	Geni di selezione, ad es. geni che conferiscono resistenza all'antibiotico ampicillina (Amp^r) e tetraciclina (Tet^r)	Geni di selezione, ad es. geni che conferiscono resistenza all'antibiotico ampicillina (Amp^r) e tetraciclina (Tet^r)
		Il transgene preceduto dal promotore (P) inserito tra le sequenze per il trasferimento e l'integrazione (in nero in figura)

Come utilizzare il plasmide Ti per trasferire geni di interesse nelle cellule vegetali?
Il plasmide Ti è di per sé un vettore ideale per introdurre DNA estraneo nelle cellule vegetali. In laboratorio sono stati ottenuti plasmidi Ti modificati in modo da introdurre il transgene desiderato nelle cellule vegetali: la tabella 2.1 riassume le caratteristiche del plasmide Ti naturale, quelle del plasmide modificato in laboratorio per essere utilizzato come vettore e quelle di un vettore contenente il transgene (plasmide ricombinante).

In genere nel plasmide Ti vettore vengono inseriti due geni che conferiscono resistenza agli antibiotici. Un gene (ad esempio per la resistenza all'ampicillina) è inserito nella regione del T-DNA e il secondo gene (ad es. quello per la resistenza alla tetraciclina) è inserito al di fuori della regione del T-DNA. Quando il gene per la resistenza all'ampicillina viene tagliato da un enzima di restrizione per inserire il transgene, esso non sarà più funzionante. I batteri che possiedono il plasmide ricombinante possono quindi essere selezionati in quanto crescono in presenza di tetraciclina e muoiono in presenza di ampicillina. A questo punto, gli Agrobatteri selezionati vengono messi a contatto con frammenti del tessuto vegetale (ad es. foglie) che si intende trasformare; la regione T-DNA del plasmide ricombinante si trasferisce nelle cellule (fig. 2.10). I tratti terminali inseriscono il gene esogeno nel DNA vegetale ed il promotore ne garantisce l'espressione. Da questi frammenti di tessuto vegetale trasformato è possibile ottenere l'intera pianta fertile in grado di trasmettere alle generazioni successive il gene esogeno, integrato nel genoma.

Figura 2.10
Confronto tra l'infezione di *Agrobacterium* in natura e in laboratorio. Nella produzione di piante GM il T-DNA non contiene i geni che inducono il tumore e la produzione di opine, bensì il transgene d'interesse.

3. Identificazione e sviluppo della pianta geneticamente modificata

L'identificazione della cellula vegetale contenente il DNA esogeno è resa possibile dalla presenza, nel vettore di trasformazione (nella regione del T-DNA), di un ulteriore marcatore di selezione (per semplicità non indicato nella tab. 2.1 e nella fig. 2.10), ad esempio la resistenza a un erbicida. Inizialmente, i geni di resistenza agli antibiotici venivano utilizzati come marcatori selettivi anche per questa fase. Tuttavia, anche se la resistenza riguardava antibiotici ormai poco usati in medici-

na, l'Unione Europea ha vietato la produzione di OGM con vettori ricombinanti contenenti geni di resistenza agli antibiotici nella regione del T-DNA, per evitare un'eventuale diffusione di geni per antibiotico-resistenze nell'ambiente.
Le cellule vengono fatte crescere in un terreno di coltura selettivo (ossia contenente, ad esempio, l'erbicida di cui è stata acquisita la resistenza) e sarà così possibile selezionare le cellule ricombinanti, che hanno integrato il gene estraneo in modo stabile nel loro genoma.

Perché si fanno gli OGM

Nell'elenco che segue sono indicati i settori produttivi e di ricerca in cui gli OGM trovano, o potrebbero trovare, varie applicazioni per la produzione di determinate sostanze:

- farmacologia e medicina (produzione di biofarmaci, molecole utili a fini terapeutici, vaccini e antibiotici, terapia genica ecc.);
- industria alimentare (modificazione del contenuto di zuccheri, aminoacidi, grassi ecc.);
- chimica e farmaceutica (enzimi, additivi, alcol, acidi, solventi, detergenti, materie plastiche, reagenti diagnostici ecc.);
- agricoltura, zootecnia e veterinaria (miglioramento genetico per rendere resistenti piante o animali alle malattie, ai pesticidi e agli stress ambientali, incremento della produzione ecc.);
- protezione ambientale (bio-risanamento di ambienti contaminati, depurazione delle acque);
- energia (estrazione del petrolio presente nelle rocce mediante produzione di sostanze tensioattive che ne favoriscono la separazione ecc.);
- biostrumentazione (chip biologici).

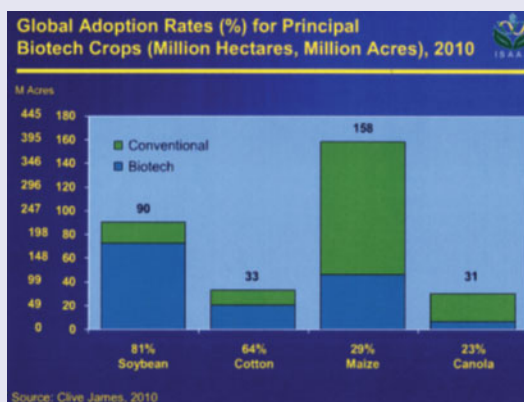
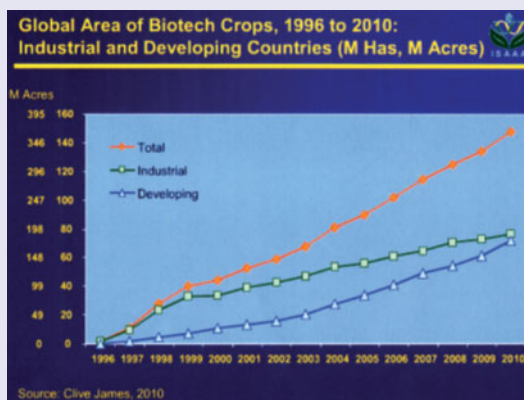
Nel settore agro-alimentare l'impiego degli OGM mira all'ottenimento di piante che esprimano nuove caratteristiche agronomiche desiderabili, quali:

- resistenza ai patogeni e ai parassiti;
- tolleranza agli erbicidi;
- miglioramento delle caratteristiche nutrizionali;
- aumento della conservabilità.

Per saperne di più

LE COLTURE OGM NEL MONDO

Ogni anno l'International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA, Servizio internazionale per l'acquisizione di applicazioni agro-biotecnologiche) compila un rapporto che fotografa lo stato delle colture transgeniche nel mondo.
Il rapporto è disponibile sul sito www.isaaa.org e comprende grafici e carte sull'estensione dei campi seminati con OGM, i paesi coltivatori, il tipo di colture (fig. 2.11).

Figura 2.11
Il grafico in alto mostra le aree coltivate, dal 1996 al 2010, con le quattro colture transgeniche più diffuse: soia, mais, cotone, colza. Nel grafico in basso, delle stesse quattro colture, sono messe a confronto le % di aree coltivate con varietà convenzionali e con varietà transgeniche.

Lo scenario

Il laboratorio di cui siete responsabili deve verificare l'eventuale presenza del gene Bt in un carico di mais destinato alla produzione di corn flakes in una ditta che certifica "prodotto senza OGM".
L'analisi comprende le seguenti fasi:

- campionamento;
- estrazione del DNA e amplificazione con PCR;
- elettroforesi;
- analisi dei risultati.

Campionamento

Il campione predisposto all'analisi deve essere il più possibile rappresentativo della matrice di partenza ed essere omogeneo. A causa del miscuglio durante la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto, un prodotto OGM potrebbe non essere ben distribuito nella matrice di partenza ed essere, ad esempio, più concentrato in un punto piuttosto che in altri; occorre perciò eseguire più prelievi dalla matrice e in punti diversi.

Estrazione del DNA e PCR

Dai campioni sottoposti a omogeneizzazione viene estratto il DNA, viene effettuata una PCR utilizzando una coppia di primer specifici per il gene Bt; successivamente, si effettua l'elettroforesi dei prodotti di PCR e si analizzano i risultati della corsa.
È opportuno sottoporre il DNA da analizzare a un "controllo di qualità" per stabilire se proviene da quel determinato organismo vegetale: in questo modo si controlla che il campionamento e l'estrazione del DNA siano avvenuti in modo corretto. Per questo si deve individuare un gene esclusivo delle cellule vegetali (ad esempio un gene per una proteina del cloroplasto) e un gene specie-specifico (ad esempio, nel caso del mais, il gene per la zeina, una proteina di riserva presente nei semi). Si esegue mediante PCR la loro amplificazione con i primer idonei e, mediante elettroforesi, si verifica la presenza dell'amplificato. Questi non sono "transgeni", ma geni "spia", i quali indicano che siamo in presenza di materiale vegetale e, in particolare, di mais. Avendo verificato queste due condizioni, si valuta se il transgene è davvero presente. La coppia di primer che si utilizza di solito in laboratorio per la ricerca del gene Bt mediante PCR amplifica un segmento di DNA lungo 189 pb, interno al gene Bt (fig. 2.12).

L'esperimento

Per eseguire l'esperimento di riconoscimento del mais OGM scaricate le schede del protocollo elettroforesi.
Le provette sono identificate da:

- PM: marcatore di peso molecolare (per il confronto dei PM);
- 1: gene per una proteina del cloroplasto (dalla PCR è atteso un amplificato di DNA di 484 pb, paia di basi);
- 2: gene per la zeina (dalla PCR è atteso un amplificato di DNA di 220 pb);
- 3: campione in cui si vuole analizzare la presenza del transgene (dalla PCR è atteso un

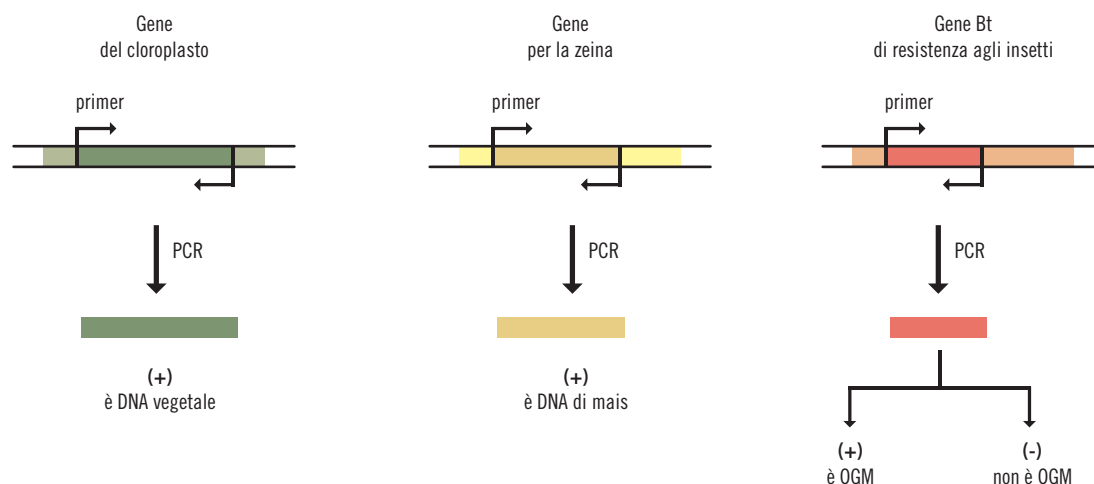



Figura 2.12
Con opportune coppie di primer si amplificano segmenti di "geni spia" (una proteina del cloroplasto e la zeina), nonché parte del gene Bt (transgene). I simboli (+) e (-) indicano rispettivamente presenza e assenza del prodotto di PCR.

amplificato di 189 pb se il transgene BT è presente);
- 4: controllo positivo (un campione standard che contiene la sequenza di DNA in esame, per dimostrare che la procedura di amplificazione funziona);
- 5: controllo negativo (un campione di DNA che non contiene il transgene ricercato);
- 6: "bianco" di PCR (costituito dalle stesse soluzioni e dagli stessi tamponi utilizzati, ma che non contiene DNA del campione. Serve per dimostrare l'assenza di DNA contaminante durante tutte le fasi di lavoro).

È OGM? Analisi dei risultati

Dal confronto con le bande nella corsia del marcatore di peso molecolare (PM) si può dedurre che il campione 1 presenta una banda di circa

Per saperne di più — L'OGM che non esiste

Quante volte sentiamo parlare di prodotti alimentari che sono stati o sono in vendita e che sono stati ottenuti con tecniche di modificazione genetica (OGM)?
Esempi famosi sono il **pomodoro e la fragola antigelo** che sono stati modificati geneticamente per resistere alle basse temperature; bene… questi prodotti non sono mai esistiti!!!
Nel 1991 la *DNA Plant Technology* cercava di rendere il pomodoro più resistente alle basse temperature introducendo nel suo genoma il gene di una delle proteine anticongelanti AFP (*Antifreeze Proteins*), presenti in pesci che vivono in acque con temperatura molto fredda.
I ricercatori della *DNA Plant Technology* non hanno trasferito direttamente nel pomodoro il gene della proteina anticongelante isolato da un pesce artico, ma hanno utilizzato la sequenza di DNA di quel gene per sintetizzare in provetta un tratto di DNA con analoga sequenza, ma più adatto ad esprimersi in organismi vegetali.
Come spesso accade nella ricerca sperimentale, è risultato che il pomodoro ottenuto non era però resistente al freddo!!! Nonostante questo, la storia del **pomodoro-pesce** ha iniziato ad essere diffusa tramite i media.
Gli scienziati hanno provato, dopo l'iniziale fallimento, ad inserire geni antigelo di varia provenienza, ma per lo più con scarso successo. Solo di recente qualche passo avanti è stato fatto, utilizzando una proteina antigelo della carote.

Le fragole antigelo
Veniamo ora all'OGM più citato della storia, la Fragola-Pesce.
In questo caso siamo di fronte ad un vero gioco di fantasia: **la fragola-pesce non esiste. Non è mai esistita** e non è stata oggetto di sperimentazione come accaduto per il pomodoro che, però, non è mai stato messo in commercio.

Il caso della farfalla monarca
Nel 1999 la rivista *Nature* pubblica una breve corrispondenza di John Losey (un entomologo americano della Cornell University) in cui si afferma che sarebbe stato dimostrato che il polline del mais Bt che si deposita nelle vicinanze dei campi di mais uccide le larve della farfalla monarca. Questa notizia fa scatenare una battaglia ecologista, dato che le farfalle monarca sembra che siano a rischio estinzione!!!
La Commissione Europea blocca l'autorizzazione alla sperimentazione del mais Bt, ma, dopo qualche settimana, l'esperimento di Losey viene analizzato con attenzione dalla comunità scientifica ed emerge che contiene numerosi errori: non è stato condotto seguendo criteri scientifici ed è giunto a conclusioni errate. Ci si accorge tra l'altro che proprio nel momento della massima diffusione del mais Bt negli Stati Uniti, la popolazione delle farfalle monarca è cresciuta da 300 a 500 milioni di esemplari.
Lo studio di Losey viene bocciato dalla comunità scientifica e lui fa marcia indietro ammettendo gli errori e la non validità dei risultati: un articolo del 2001 su PNAS fornisce le prove scientifiche che l'utilizzo del mais Bt non minaccia la farfalla monarca. Purtroppo, come spesso succede, le smentite non hanno nei media lo stesso risalto delle notizie più clamorose e l'opinione pubblica rimane influenzata nel dibattito sulla pericolosità degli OGM.

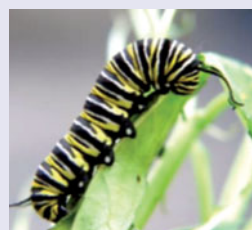
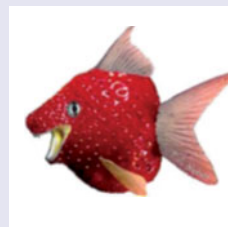
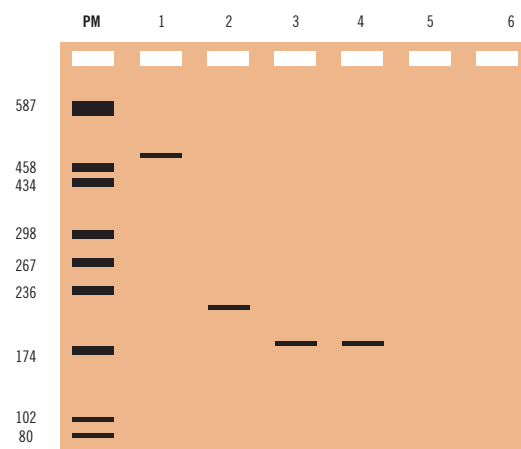



Figura 2.13
Schema del risultato della corsa elettroforetica.

480 pb, e cioè della lunghezza attesa per il gene della proteina del cloroplasto (fig. 2.13). Il campione 2 presenta una banda di circa 220 pb, e cioè della lunghezza attesa per il gene della zeina. Si può concludere che si è in presenza di DNA vegetale di mais. Inoltre il DNA non è stato eccessivamente frammentato durante l'estrazione, in quanto sono presenti frammenti amplificabili di almeno 200 pb. Questa informazione è importante perché il frammento del gene Bt da amplificare è lungo 189 pb ed è necessario, quindi, sapere che il DNA da analizzare contiene frammenti di lunghezza paragonabile.

Il campione 3 presenta una banda identica a quella del controllo positivo (campione 4). Ciascuna di queste bande è di 189 pb. Poiché la banda è assente sia nel controllo negativo che nel "bianco" di PCR, si deduce che essa è la banda relativa al gene ricercato. Quindi, nel campione preso in esame è presente mais geneticamente modificato.

Data la elevata sensibilità della PCR, che riesce ad amplificare un singolo tratto di DNA presente in quantità minime (10 pg) di DNA genomico, sarebbe opportuno allestire, oltre al controllo positivo e negativo (vedi sopra), ulteriori reazioni di controllo, per verificare che ogni fase del lavoro è stata eseguita correttamente. Nei laboratori specializzati nelle analisi di OGM che rilasciano certificazione ufficiale sono obbligatori i seguenti ulteriori controlli:

- un controllo ambientale, che consiste in una provetta contenente acqua lasciata aperta durante tutto il processo di analisi (dall'omogeneizzazione all'amplificazione) per dimostrare che non ci sia contaminazione nell'aria del laboratorio;
- controllo di assenza di inibizione della reazione di PCR. Il DNA estratto dal campione viene amplificato con primer per una sequenza endogena sicuramente amplificabile. In questo modo si verifica l'assenza di sostanze di inibizione della PCR nel DNA estratto, che potrebbero dare falsi risultati negativi.

3. Sano o malato?

L'esperimento che viene illustrato riguarda l'analisi del DNA per individuare una mutazione genica recessiva a carico del gene della ß-globina che è causa dell'anemia falciforme.
Dallo studio del DNA di vari membri di una famiglia nella quale si è manifestata l'anemia falciforme si potrà riconoscere l'esistenza della mutazione in forma omozigote o eterozigote e quindi fare una diagnosi di malattia o di portatore sano ai componenti dell'albero genealogico.

Cosa vuol dire essere in buona salute? Ed essere malato?

Chi dei quattro bambini in figura 3.1 è malato? Sicuramente rispondereste il bambino a letto, con la febbre e l'influenza, ma...
Potremmo sospettare che anche gli altri siano malati ma ancora senza sintomi oppure siano portatori di malattie genetiche o addirittura abbiano mutazioni genetiche dominanti a insorgenza tardiva, cioè che si manifestano solo in età adulta, e allora... proviamo a riflettere sulla definizione di sano e malato.
Risulta forse più facile definire la condizione di malattia, soprattutto quando si pensa a situazioni acute o gravi; infatti secondo l'OMS, l'Organizzazione Mondiale della Sanità, essere malato significa "essere in una qualsiasi condizione del corpo e della mente che diminuisce le capacità di sopravvivenza dell'individuo". Riassumendo, malato significa non in salute, mentre sano significa "stato di completo benessere fisico, psichico, sociale e culturale e non semplice assenza di malattia".
Qui ci occuperemo delle malattie ereditarie e di come in alcuni casi sia possibile determinare a livello molecolare l'esistenza nella sequenza di DNA di mutazioni trasmissibili di generazione in generazione.

Che cos'è il pedigree

Uno dei campi d'indagine della Genetica è lo studio dei meccanismi con cui i geni sono trasmessi dai genitori ai figli. A tale scopo i genetisti effettuano accoppiamenti tra organismi della stessa specie per analizzare la trasmissione dei caratteri. Nella Genetica umana gli accoppiamenti sperimentali ovviamente non sono possibili. Molte delle nostre conoscenze sull'ereditarietà dei caratteri umani derivano perciò dalla analisi degli alberi genealogici o **pedigree**.
In pratica, il pedigree è la rappresentazione sistematica della storia familiare attraverso l'uso di simboli standardizzati (fig. 3.2). Il pedigree viene stilato partendo dall'intervista ai componenti di una famiglia, al fine di ricostruirne la storia (anamnesi); in questo modo è possibile seguire la trasmissione di un carattere in una data famiglia per alcune generazioni (fig. 3.3).

Conoscenze propedeutiche

- Le leggi di Mendel
- Le mutazioni geniche
- Le malattie monogeniche
- Gli enzimi di restrizione

Figura 3.1
Chi dei quattro bambini in figura è malato?

Figura 3.2
I simboli usati nell'analisi del pedigree adottati nel 1995 dalla Società Americana di Genetica Umana.

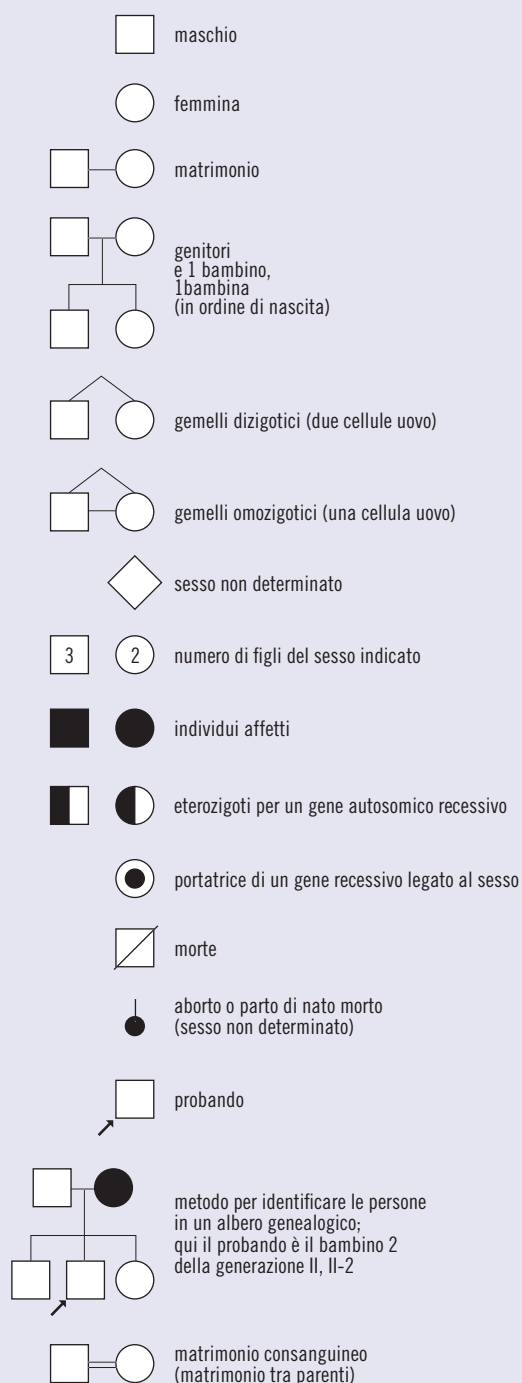
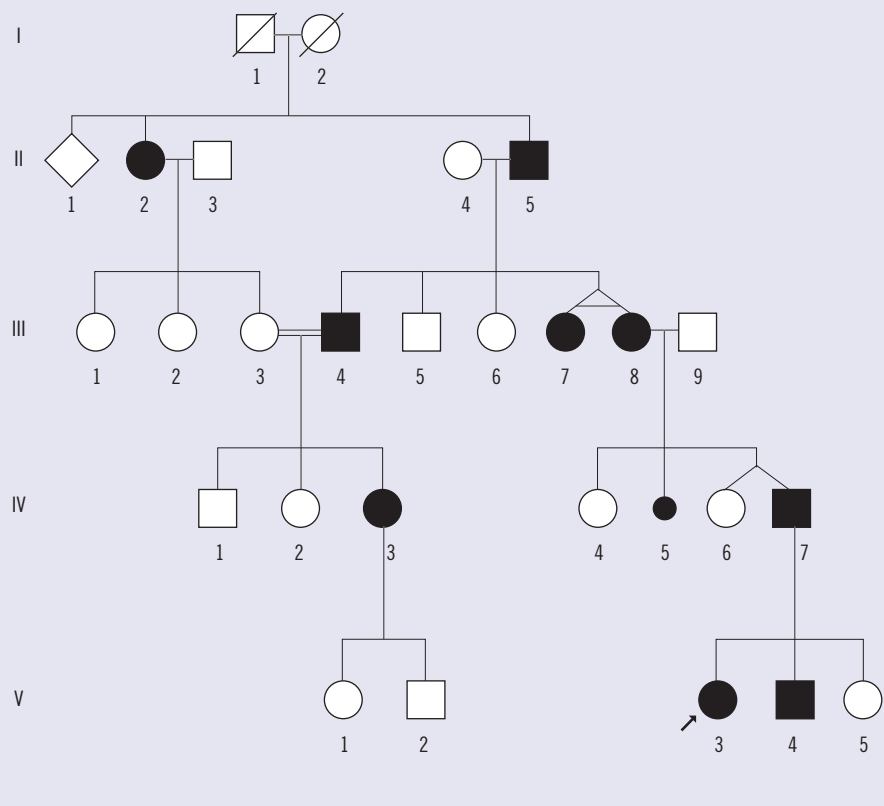
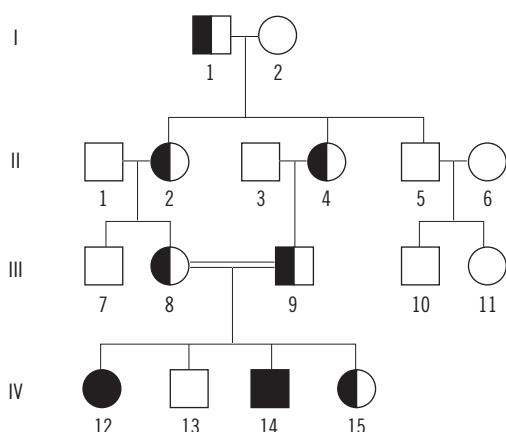
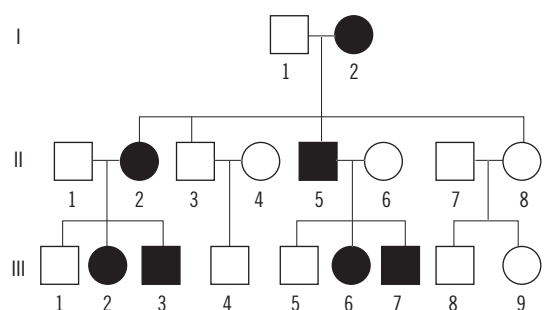



Figura 3.3
Un pedigree che mostra la trasmissione ereditaria di un carattere (i simboli scuri rappresentano gli individui affetti) attraverso alcune generazioni di una famiglia. Le diverse generazioni vengono indicate con i numeri romani, partendo da quelle più lontane nel tempo.

L'analisi del pedigree per la determinazione delle modalità di trasmissione di malattie o di caratteri monogenici

Dall'analisi di un pedigree si può determinare (talvolta non in modo univoco, in quanto un pedigree può essere compatibile con più di una modalità di trasmissione ereditaria) se un carattere ha una modalità di trasmissione recessiva o dominante e se il gene in questione è localizzato su un autosoma o su un cromosoma sessuale. In ultima analisi, si possono informare i membri di una famiglia sulla probabilità di trasmettere un determinato carattere ai propri figli. Analizziamo le caratteristiche dei pedigree relativi a caratteri:

- autosomici recessivi (AR);
- autosomici dominanti (AD);
- legati al cromosoma X recessivi (XR);
- legati al cromosoma X dominanti (XD);
- legati al cromosoma Y.

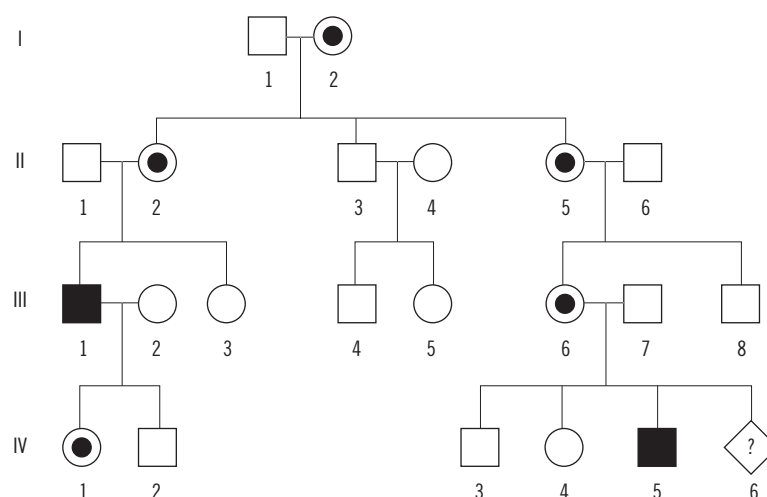
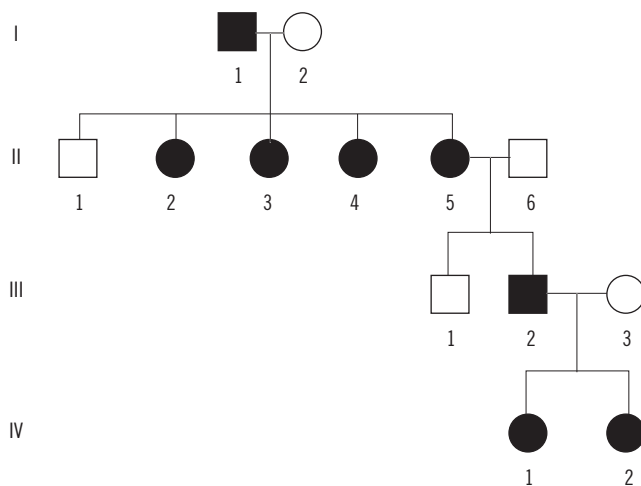
Eredità autosomica recessiva di un gene legato a una malattia ("gene-malattia")

- Possono essere affetti sia i maschi sia le femmine.
- In genere gli individui affetti hanno genitori sani (portatori asintomatici).
- I genitori, entrambi portatori sani, hanno il 25% di probabilità di avere figli malati a ogni gravidanza.
- L'incidenza della malattia aumenta in caso di consanguineità.
- Tutti i figli di genitori entrambi affetti (omozigoti) sono a loro volta affetti.

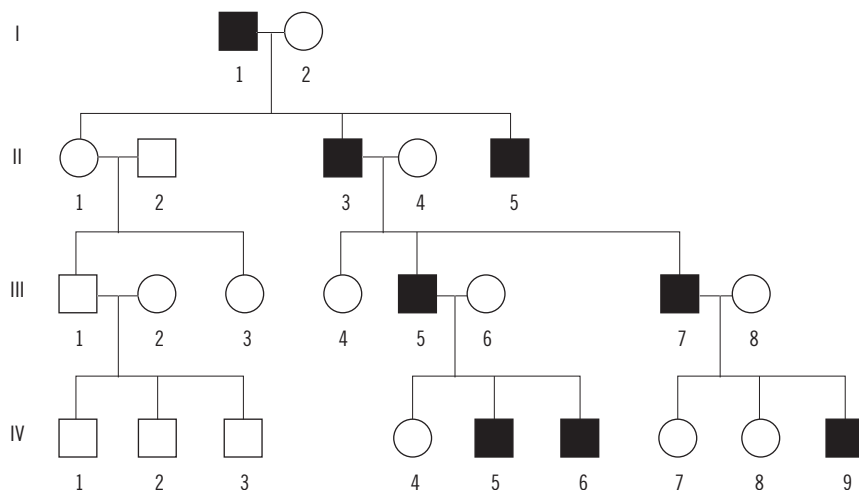
Eredità autosomica dominante di un "gene-malattia"

- Possono essere affetti sia i maschi sia le femmine.
- Gli individui affetti possono essere presenti in tutte le generazioni.
- Gli individui affetti hanno sempre un genitore affetto.
- Poiché i geni responsabili di malattie autosomiche dominanti sono rari, in genere gli individui affetti sono eterozigoti. Rarissimi sono gli omozigoti, che possono nascere solo da genitori entrambi eterozigoti. Ogni affetto (eterozigote) ha il 50% di probabilità di avere figli malati.
- Genitori entrambi affetti (eterozigoti) possono avere figli sani (25%).
- I genitori di un bambino malato possono essere sani: in questo caso si può dedurre che la malattia origina da una nuova mutazione verificatasi durante la formazione di un gamete (mutazione *de novo*).

Per saperne di più

LE MALATTIE EREDITARIE

All'origine di una malattia genetica vi è la presenza di una o più mutazioni nel genoma di tutte o di una parte delle cellule di un individuo; le malattie genetiche sono ereditarie solo se le mutazioni sono presenti nelle cellule germinali (ovociti o spermatozoi); i sintomi (più o meno gravi) di una mutazione possono manifestarsi precocemente, anche in epoca prenatale, o dopo un periodo di latenza anche molto lungo, come nel caso della Còrea di Huntington, una patologia dovuta a una mutazione dominante che si manifesta solo nell'età adulta.
Le malattie ereditarie possono essere **malattie monogeniche** o **monofattoriali**, determinate da mutazioni in un singolo gene e che si trasmettono nelle famiglie secondo le leggi di Mendel, oppure possono essere **malattie poligeniche** (es. allergie, diabete, ipertensione ecc.), causate da difetti genetici a carico di più di un gene e la cui ereditarietà è di tipo non mendeliano. Le malattie, e più in genere i caratteri poligenici, possono essere più o meno condizionati da fattori non genetici, cioè dall'**ambiente** e in questi casi vengono definiti **multifattoriali** (es. arteriosclerosi e malattie cardiovascolari in genere, obesità ecc.).

Eredità recessiva di un "gene-malattia" localizzato sul cromosoma X

- La frequenza della malattia è maggiore nei maschi che nelle femmine.
- Le femmine possono essere portatrici sane.
- Le donne portatrici hanno un rischio del 50% di avere figli maschi malati.

- I maschi affetti hanno figlie portatrici sane e figli maschi sani.
- La madre di un individuo affetto è portatrice sana.

Eredità dominante di un "gene-malattia" localizzato sul cromosoma X
- Maschi affetti generano solo femmine affette, mentre i figli maschi sono sempre sani.
- Femmine eterozigoti affette trasmettono il carattere al 50% dei figli, siano essi maschi o femmine.

Eredità legata al cromosoma Y
- Sono stati individuati pochi caratteri legati al cromosoma Y.
- I caratteri si manifestano solo nei maschi
- Sono trasmessi direttamente da padre a figlio (eredità olandrica).

La Bioinformatica al servizio della Genetica: la banca dati OMIM

Esiste in internet una banca dati che contiene informazioni sui geni umani e sulle malattie genetiche realizzata e mantenuta dall'NCBI, National Center for Biotechnology Information. La banca contiene la descrizione dei geni e delle malattie a essi associate, i quadri clinici e i riferimenti bibliografici, oltre a link ad altre risorse web. Si tratta della versione online del testo *Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), a cura del genetista medico Victor A. McKusick e di un gruppo di colleghi della Johns Hopkins University e di altre istituzioni. La banca dati OMIM riporta solo malattie che sono state associate a uno o più geni ed è aggiornata quotidianamente.

La pagina di accesso a OMIM si raggiunge tramite un link sulla homepage dell'NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). In tabella 3.1 sono riportate alcune malattie monogeniche con il codice identificativo OMIM.

I polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) e il loro utilizzo nella diagnosi di malattie genetiche

Gli enzimi di restrizione (ER, tab. 3.3) sono "forbici molecolari" in grado di tagliare la doppia elica del DNA in siti specifici (lunghi 4-8 paia di basi) detti "siti di restrizione" generando numerosi frammenti di diversa lunghezza. Ogni enzima genera una serie di frammenti di DNA numerosi detta *pattern* di restrizione, specifica per una data specie.
Una mutazione nella sequenza di basi del DNA può creare o distruggere un sito di restrizione; digerendo il DNA di individui diversi con uno stesso ER, si osserva quindi un polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (in inglese *Restriction Fragment Length Polymorphism* o RFLP).
Come tutti i polimorfismi, i RFLP sono ereditabili come **caratteri mendeliani semplici** (fig. 3.7) e sono trasmessi come caratteri **codominanti**. Il fenotipo di un RFLP è evidenziabile in termini di differenze di numero e/o dimensione

Per saperne di più

NOMENCLATURA DELLE MUTAZIONI

Un gene può mutare con modalità diverse e ogni alterazione della sequenza è classificata da una nomenclatura che descrive il cambiamento avvenuto a livello nucleotidico o della sequenza aminoacidica.

Sostituzione di nucleotidi
La nomenclatura 1162(G > A) indica che in posizione 1162 della sequenza nucleotidica una guanina è stata sostituita da un'adenina.

Delezioni e inserzioni di nucleotidi
La nomenclatura nt6232 (del5) indica che sono stati deleti 5 nucleotidi a partire dalla posizione 6232. La nomenclatura nt409 (insC) indica che dopo il nucleotide in posizione 409 è inserita una citosina. La nomenclatura ΔF508 indica la delezione della tripletta che codifica per l'aminoacido fenilalanina che si trova in posizione 508 nella sequenza aminoacidica.

Sostituzione di aminoacidi (*vedi* tab. 3.2)
La nomenclatura R117H indica che in posizione 117 della sequenza aminoacidica un'arginina è stata sostituita da una istidina.
La nomenclatura G542X indica che in posizione 542 della sequenza aminoacidica un codone glicina è stato convertito in un segnale di stop.

A	Ala	ALANINA	N	Asn	ASPARAGINA
C	Cys	CISTEINA	P	Pro	PROLINA
D	Asp	ACIDO ASPARTICO	Q	Gln	GLUTAMMINA
E	Glu	ACIDO GLUTAMMICO	R	Arg	ARGININA
F	Phe	FENILALANINA	S	Ser	SERINA
G	Gly	GLICINA	T	Thr	TREONINA
H	His	ISTIDINA	V	Val	VALINA
I	Ile	ISOLEUCINA	W	Trp	TRIPTOFANO
K	Lys	LISINA	Y	Tyr	TIROSINA
L	Leu	LEUCINA	X		CODONE DI STOP
M	Met	METIONINA			

Tabella 3.2
Ogni aminoacido viene indicato con il codice a 1 e a 3 lettere.

Tabella 3.1
Alcune malattie monogeniche di cui è indicata la frequenza nella popolazione adulta, il tipo di trasmissione, la localizzazione cromosomica e il numero del catalogo OMIM.

MALATTIE MONOGENICHE	FREQUENZA IN POPOLAZIONE ADULTA	TIPO DI TRASMISSIONE	LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA	REF. OMIM
Ipercolesterolemia familiare	1 / 500	Autosomica dominante	Cromosoma 19	143890
Corea di Huntington	1 / 20 000	Autosomica dominante	Cromosoma 4	143100
Policistite renale dell'adulto	1 / 1000 nati vivi	Autosomica dominante	Cromosoma 16	173900
Fibrosi cistica	1 / 2000 – 4000 popolazione caucasica	Autosomica recessiva	Cromosoma 7	219700
Anemia falciforme (HbS)	Molto rara in Europa, molto diffusa nella popolazione nera in Africa e in America	Autosomica recessiva	Cromosoma 11	141900.0243
Talassemia	Molto frequente nel bacino Mediterraneo (1 / 250)	Autosomica recessiva	Cromosoma 11 catene beta; cromosoma 16 catene alfa	Alfa: 141800 Beta: 141900
Fenilchetonuria	1 / 10 000 nati vivi	Autosomica recessiva	Cromosoma 12	261600
Ipofosfatemia familiare	1 / 20 000	X-linked dominante	Cromosoma X	307800
Emofilia A	1 / 5000 – 10 000 nei maschi	X-linked recessiva	Cromosoma X	306700
Daltonismo (Cecità al verde e al rosso)	8% nei maschi; 0,64% nelle femmine	X-linked recessiva	Cromosoma X	303800
Miopatia di Duchenne	1 / 6000 nei maschi	X-linked recessiva	Cromosoma X	310200

NOME DELL'ER	PRONUNCIA	ORGANISMO DI PREVENZIONE	SITO DI RESTRIZIONE E POSIZIONE DEL TAGLIO
BamHI	bam-acca-uno	*Bacillus amyloliquefaciens H*	G/GATCC CCTAG/G
EcoRI	eco-erre-uno	*Escherichia Coli RY13*	G/AATTC CTTAA/G
HindIII	ind-tre	*Haemophilus influenzae*	A/AGCTT TTCGA/A
DdeI	di-di-e-uno	*Desulfovibria desulfuricans*	C/TNAG GANT/C
MstII	emme-esse-ti-due	*Microcaleus species*	CC/TNAGG GGANT/CC
SmaI	sma-uno	*Serratia marcescens*	CCC/GGG GGG/CCC

Tabella 3.3
Alcuni ER con relativo organismo di provenienza, sito di restrizione e posizione del taglio indicata con / su ciascun filamento di DNA.

Per saperne di più

ETEROGENEITÀ GENICA E PLEIOTROPIA

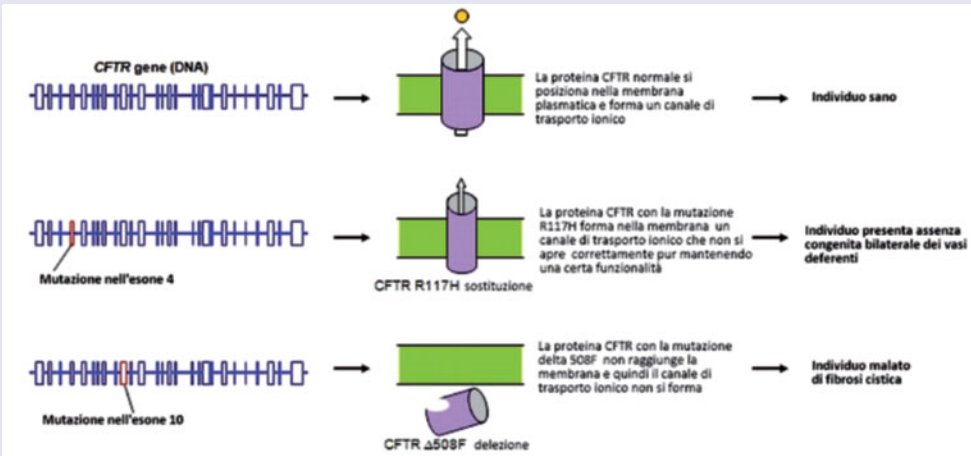



Figura 3.4
Descrizione dell'effetto di due tipi di mutazione a carico di esoni diversi nel gene CFTR sulla proteina di membrana.

Figura 3.5
Apoproteina B-100 che media il legame tra una lipoproteina LDL e il recettore sulla membrana cellulare.

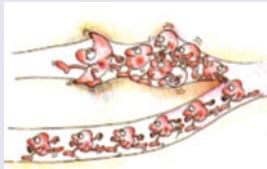
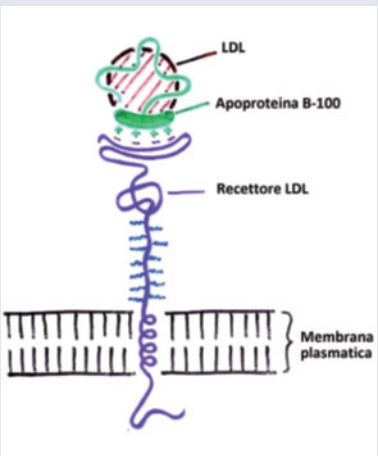



Figura 3.6
Ostruzione dei capillari sanguigni da parte di globuli rossi falcemici.

Eterogeneità Genica
Per alcune malattie ereditarie monogeniche tutti gli individui affetti portano un'identica mutazione: l'anemia falciforme ne è un esempio. Per molte altre malattie ci sono invece più mutazioni che possono produrre lo stesso quadro patologico. Quando le diverse mutazioni sono a carico dello stesso gene si parla di **eterogeneità allelica**. Nel caso dell'emofilia A, ad esempio, il catalogo OMIM riporta 270 varianti alleliche. Un altro esempio è la fibrosi cistica, causata da più di 1000 mutazioni diverse nel gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor*). Le diverse mutazioni possono produrre fenotipi di gravità diversa (fig. 3.4). Nel caso in cui le mutazioni avvengano in geni diversi che collaborano alla determinazione di un fenotipo si parla di **eterogeneità di *locus***. Ad esempio, in una stessa via metabolica, mutazioni in geni diversi possono portare alla stessa modificazione del fenotipo.
È il caso delle due forme di ipercolesterolemia familiare A e B, dovute rispettivamente a mutazioni nel gene del recettore che lega le lipoproteine LDL (*Low Density Lipoprotein*), localizzato sul cromosoma 19, e del gene della apoproteina B-100 (sul cromosoma 2) che media il legame della LDL al recettore (fig. 3.5).

Pleiotropia
Questo concetto sta a indicare che un solo gene può essere responsabile di fenotipi diversi. Un esempio di pleiotropia nell'uomo è quello dell'anemia falciforme, una malattia caratterizzata da diversi sintomi a carico di organi e tessuti diversi. Questi possibili effetti fenotipici derivano tutti dall'azione di un solo allele mutato presente in omozigosi. L'effetto diretto dell'allele dell'anemia falciforme è quello di indurre i globuli rossi a produrre molecole anomale di emoglobina che tendono a unirsi fra loro e cristallizzare. Di conseguenza i globuli rossi assumono una caratteristica forma a falce, diventano fragili, lisano e tendono ad aggregarsi occludendo i capillari (fig. 3.6). Tutto questo produce molteplici danni a carico di organi e tessuti diversi (Vedi per saperne di più a pag.9).

Figura 3.7
Sono mostrati i frammenti di restrizione ottenuti con digestione con l'enzima *EcoRI* di due alleli (1 e 2) di un gene.
Nella parte bassa della figura i prodotti della digestione del DNA dei genitori e dei figli vengono separati mediante corsa elettroforesi.
I genitori (corsia 1 e 2), il cui DNA mostra 3 bande corrispondenti a frammenti da 500, 350 e 150 pb (paia di basi), sono eterozigoti (1/2); il figlio (corsia 3), il cui DNA mostra 2 bande corrispondenti a frammenti da 350 e 150 pb, è omozigote per l'allele 1 (1/1); la figlia (corsia 4), il cui DNA mostra una sola banda da 500 pb, è omozigote per l'allele 2 (2/2).

dei frammenti di DNA ottenuti dalla digestione con un certo enzima di restrizione. I frammenti sono visibili dopo migrazione elettroforetica su un gel di agarosio (fig. 3.7).

La tecnica della PCR per l'analisi degli RFLP

Le applicazioni della PCR sono praticamente infinite. Uno degli ambiti di utilizzo è la diagnosi di malattie genetiche mediante analisi dei RFLP. La PCR consente di analizzare uno specifico tratto di DNA, invece di dover lavorare su tutto il DNA nucleare di una cellula, ossia sul DNA genomico. Per fare diagnosi di una malattia genetica mediante analisi di un RFLP si amplifica la regione di DNA utilizzando una coppia di primer posizionati a monte e a valle del sito di restrizione (figg. 3.7 e 3.8). Il segmento di DNA amplificato viene sottoposto a **digestione** con l'enzima di restrizione e i prodotti della digestione vengono separati mediante elettroforesi.

Figura 3.8
I primer della PCR vengono disegnati a monte e a valle del sito di restrizione. La digestione con ER dei prodotti di PCR genera due frammenti per l'allele 1 e lascia il frammento intero per l'allele 2.

Diagnosi molecolare di anemia falciforme: utilizzo di un RFLP nella diagnosi diretta

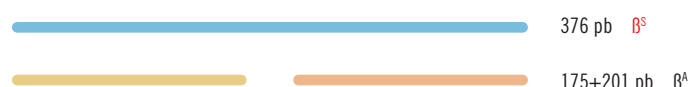
Gli individui affetti da anemia falciforme sono omozigoti per la **mutazione HbS**, che consiste nella sostituzione di un singolo aminoacido dei 146 che formano la **catena β dell'emoglobina**. Nell'emoglobina HbS, l'acido glutammico (Glu) nella sesta posizione della catena β è sostituito dalla valina (Val). La sostituzione aminoacidica è dovuta alla mutazione A --> T nella posizione mediana del codone 6 (fig. 3.9 in alto).

La sostituzione che converte il codone GAG (acido glutammico) nel codone GTG (valina) modifica la sequenza CCTGAGG (che interessa i codoni 5, 6 e 7) riconosciuta e tagliata dall'enzima di restrizione *MstII*.

Figura 3.9
La figura mostra l'enzima di restrizione *MstII* che riconosce e taglia la sequenza CCTGAGG. Il DNA dell'allele $β^A$ viene tagliato dall'enzima di restrizione. Una mutazione di una singola base fa perdere il sito di taglio dell'enzima *MstII* e il DNA dell'allele $β^S$ non viene tagliato dall'enzima. Nella parte bassa della figura si vede il risultato della corsa elettroforetica del DNA di un individuo normale, di un portatore sano e di un individuo affetto da anemia falciforme, amplificati con PCR (utilizzando i primer indicati dalle frecce blu) e successivamente digeriti con l'enzima *MstII*. L'individuo normale ($β^A β^A$) mostra 2 bande, il portatore sano ($β^A β^S$) mostra 3 bande e l'individuo affetto ($β^S β^S$) mostra una sola banda di lunghezza corrispondente al DNA non tagliato.

Figura 3.10
Frammenti attesi dopo amplificazione con PCR e digestione con *MstII* degli alleli Beta^S e Beta^A.

376 pb β^S

175+201 pb β^A

In questo caso, la stessa mutazione che causa la malattia altera anche un sito di restrizione. La semplice digestione con l'enzima di restrizione consente di fare diagnosi diretta di malattia e di riconoscere i portatori.
Gli individui omozigoti ed eterozigoti sono distinguibili in base al tipo di bande ottenute dopo digestione del loro DNA con l'enzima *MstII* (fig. 3.8, in basso). Amplificando con la PCR un segmento di DNA di 376 pb, che comprende l'esone 1 e il sito *MstII* (posizionato 175 pb dall'estremità 5'), e digerendo poi il prodotto della PCR con l'enzima di
restrizione *MstII* (fig. 3.9), qual è il numero e la lunghezza (in pb) delle bande che vi aspettate di trovare nel caso di individui omozigoti normali, eterozigoti o omozigoti affetti?
Anche se sarebbe sufficiente analizzare solo il DNA del feto, analizzeremo anche il DNA dei genitori e quello dei fratelli sani per confermare la condizione di eterozigosità dei genitori e poter identificare tra i fratelli un eventuale portatore.

Per saperne di più

UTILIZZO DI UN RFLP NELLA DIAGNOSI INDIRETTA. RICERCA DI UN RFLP ASSOCIATO A UN ALLELE-MALATTIA

A differenza di quello che avviene nel caso dell'anemia falciforme, la maggior parte delle malattie genetiche sono dovute a numerose mutazioni diverse dello stesso gene. In questo caso le diverse mutazioni responsabili della malattia non generano necessariamente un RFLP che possa essere usato per la diagnosi diretta. È invece possibile trovare uno o più RFLP associati al gene-malattia (in quanto localizzati all'interno o nelle vicinanze del gene) che possono essere utilizzati per la diagnosi: si tratta in questo caso di diagnosi indiretta per associazione e non di diagnosi diretta.
Per poter utilizzare un RFLP come marcatore occorre che il gene responsabile della malattia sia collocato così vicino al RFLP che quest'ultimo possa rivelare la presenza stessa dell'allele malato.
Un particolare RFLP può essere associato in alcuni individui con l'allele-malattia e in altri con l'allele sano. Pertanto, per poter utilizzare un RFLP nella diagnosi indiretta, è necessario esaminare non soltanto il DNA del malato, ma il maggior numero possibile di membri della famiglia per identificare il tipo di associazione presente in quel pedigree (fig. 3.11).
A differenza della diagnosi diretta, l'accuratezza della diagnosi per associazione è del 100% solo quando il *locus* malattia e il RFLP sono strettamente associati (vicini sul cromosoma). In questo caso, infatti, la frequenza di *crossing-over* che può modificare l'associazione è trascurabile. Tanto maggiore è la distanza tra il RFLP e il *locus* genico di interesse, tanto più bassa è la probabilità di una diagnosi accurata.
L'importanza dei RFLP come marcatori genetici di associazione sta nel fatto che consentono la diagnosi della malattia anche in casi in cui non è noto il gene responsabile. I marcatori RFLP (nel genoma umano sono stati identificati migliaia di RFLP e diverse centinaia sono stati assegnati a ciascun cromosoma) hanno consentito la mappatura di alcuni importanti geni-malattia (ad esempio, è stato possibile localizzare il gene della fibrosi cistica in posizione distale del braccio lungo del cromosoma 7).
Un secondo aspetto da prendere in considerazione è che non sempre un dato RFLP può essere utilizzato ai fini della diagnosi indiretta. È necessario che nella famiglia siano presenti i due alleli (se tutti gli individui della famiglia sono portatori dello stesso allele del RFLP, studiare quel RFLP in quella famiglia non è significativo!).

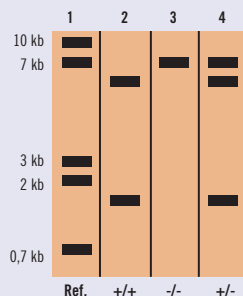
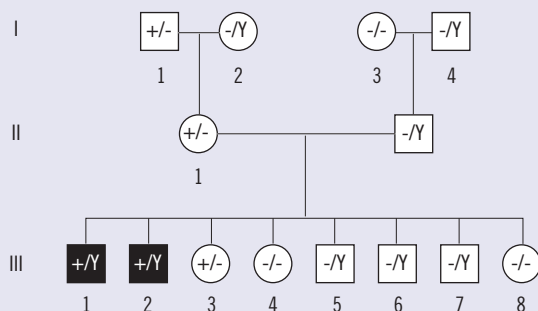



Figura 3.11
Il pedigree mostra l'ereditarietà di un marcatore RFLP attraverso tre generazioni di una famiglia in cui è presente una malattia recessiva legata al cromosoma X. Nella famiglia sono presenti gli alleli (+), presenza di sito di restrizione, e (-), assenza del sito di restrizione. Tutti gli individui malati sono maschi e presentano l'allele (+). Tutti gli individui portatori dell'allele (-) sono sani; si può dedurre che l'allele malattia sia strettamente associato all'allele (+) di questo RFLP. Sia la madre (II 1) che la nonna I 1 sono eterozigoti portatrici sane in cui l'allele (+) è associato all'allele malattia. L'allele (-) del RFLP è associato all'allele sano del gene malattia, come dimostrato da I 2, III 5, III 6 e III 7.
Nella figura a destra una corsa elettroforetica del DNA di individui con alleli +/+, -/- e +/- dopo digestione con ER.

L’esperimento

Simuliamo una consulenza genetica

Siete un genetista medico e lavorate in un consultorio genetico.
Si presenta una giovane donna (età 35 anni) che vive a Milano ma è di origine sarda. Ha avuto 3 figli. I primi due, un maschio e una femmina, sono sani. Al terzo figlio, maschio, che aveva manifestato un ittero dovuto a una crisi emolitica, è stata diagnosticata l’anemia falciforme. È in attesa di un quarto figlio (è alla fine della sesta settimana di gravidanza) e vorrebbe informazioni sul rischio di avere un altro figlio malato. Aggiunge che un suo zio materno scapolo ha la stessa patologia. A una indagine più approfondita, la donna riferisce che suo marito, il padre dei suoi figli, è anch’esso sardo di origine ed è suo cugino primo.
Viene suggerito alla donna di sottoporsi ad amniocentesi per effettuare l’analisi del DNA e determinare il genotipo del nascituro.
Sapendo che l’anemia falciforme è una malattia autosomica recessiva costruite, in base ai dati raccolti dall’anamnesi familiare il pedigree della famiglia.
Che probabilità ha il nascituro di essere sano? Di avere l’anemia falciforme? Di essere portatore dell’allele mutato?
L’analisi del DNA consente di identificare il genotipo del nascituro e, quindi, di trasformare una probabilità in un dato certo.
Anche se sarebbe sufficiente analizzare solo il DNA del feto, analizzeremo anche il DNA dei genitori e quello dei fratelli sani per confermare la condizione di eterozigosità dei genitori e poter identificare tra i fratelli un eventuale portatore. Vengono fornite delle provette contenenti i prodotti di PCR ottenuti amplificando il DNA dei diversi famigliari analizzati (fig. 3.12). Le provette sono identificate nel seguente modo (tra parentesi è indicata la loro posizione nel pedigree):

- il padre (III1),
- la madre (III2),
- il primo figlio (IV1),

Scenario anemia falciforme

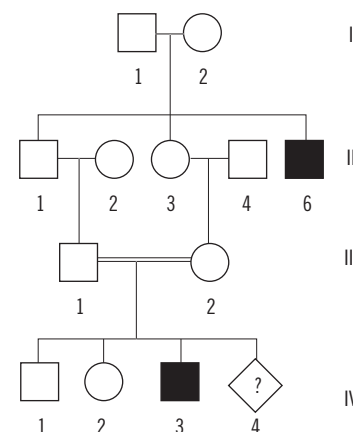



Figura 3.12
Albero genealogico della famiglia esaminata; il probando è il figlio che deve ancora nascere della 4° generazione (indicato con un rombo e un punto di domanda poiché ancora non se ne conosce il sesso).

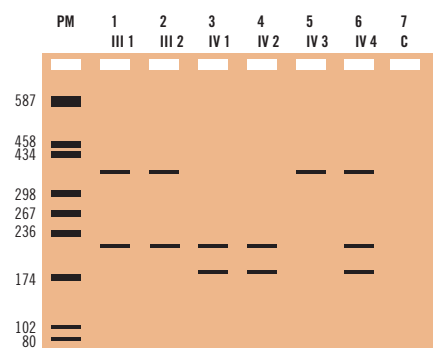
Per saperne di più — **ANEMIA FALCIFORME (SCD)**

L’**anemia falciforme**, chiamata anche **drepanocitosi** e ***sickle cell disease*, SCD,** (dal nome greco e inglese usato rispettivamente per indicare la parola italiana “falce”), è una malattia ereditaria **autosomica recessiva** caratterizzata dalla classica forma a falce che hanno i globuli rossi degli individui affetti.

Manifestazioni patologiche
La malattia si manifesta nei primi due anni di vita con un **ampio spettro di sintomi** a carico di organi e sistemi diversi legati: all’aumentata distruzione dei globuli rossi (emolisi) che contengono emoglobina S (la vita media di un globulo rosso falcemico è di soli 20 giorni anziché di 120, come invece avviene per i globuli rossi normali), alle crisi da **occlusione dei vasi** sanguigni e all’accumulo di cellule falciformi nella milza, l’organo deputato alla distruzione dei globuli rossi. La **lisi dei globuli rossi** causa anemia cronica con conseguente ittero, scarso sviluppo fisico, ritardo mentale, insufficienza cardiaca. L’insufficiente apporto di sangue a vari distretti causa danni a diversi tessuti e organi, infarti cerebrali (ictus), necrosi ossee, sindrome polmonare acuta che può risultare letale, crisi dolorose improvvise di durata variabile, tumefazioni dolorose al dorso delle mani e dei piedi (dactilite). L’**accumulo di globuli rossi falcemici** nella milza la costringe a un iperlavoro e ne provoca ingrossamento e fibrosi con riduzione della funzionalità e conseguente aumento della suscettibilità alle infezioni. Negli omozigoti la malattia è grave e di solito conduce a morte in età infantile. Negli eterozigoti invece è benigna, rendendosi evidente solo in occasione di particolari sforzi che richiedono notevole consumo e trasporto efficiente di ossigeno.

Terapia
Attualmente non esiste una terapia in grado di risolvere tutte le patologie legate all’anemia falciforme. Si possono, però, utilizzare vari **farmaci** che possono attenuare i sintomi e rendere più sopportabile la vita per i malati. Per esempio, si usano antidolorifici per sedare le crisi dolorose, antibiotici e vaccini per curare e prevenire le infezioni, trasfusioni di sangue che diluiscono i globuli rossi anomali e riducono le complicanze legate al sovraccarico di lavoro della milza. Si può inoltre ricorrere al **trapianto di midollo osseo**.

Frequenza dell’allele dell’anemia falciforme
Questa malattia è rara in Europa, ma molto frequente in Africa, tra i neri d’America e in genere nelle zone malariche del pianeta. Questa diversa distribuzione è dovuta al fatto che i globuli rossi degli individui portatori (eterozigoti) hanno maggiore resistenza verso il *Plasmodium falciparum*, l’agente della malaria, rispetto ai globuli rossi dei soggetti sani. Questo vantaggio genetico degli eterozigoti ha favorito il mantenimento dell’allele dell’anemia falciforme nelle zone malariche. Dopo la bonifica di tali zone, la frequenza dell’allele β^S diminuisce: per esempio, nella popolazione di neri americani, dopo più di 6 generazioni, la frequenza dell’allele β^S è 5% (frequenza di malati alla nascita 1/500 e circa 1 individuo su 12 è eterozigote), mentre nella regione dell’Africa da cui provengono la frequenza supera il 20% (1/25 è malato) (vedi tab. 3.1). Lo stesso vale per i cittadini americani con origini nelle regioni paludose dell’Italia, della Grecia, di Cipro e del Medio Oriente.

Figura 3.13
Schema del gel dopo corsa elettroforetica; si evidenziano i genotipi dei soggetti eterozigoti (tre bande, corsie 1, 2, 6), omozigoti normali (due bande, corsie 3 e 4), omozigoti affetti (una banda, corsia 5).

- la figlia (IV2),
- il figlio malato (IV3),
- il probando, cioè l'individuo da cui è nata la richiesta di analisi genetica, in questo caso il feto (IV4).

Aggiungete a ogni provetta eppendorf contenente 8 µl di DNA 2 µl di enzima di restrizione *MstII*, con l'opportuno tampone di digestione.
Posizionate le provette in un termoblocco alla temperatura di 37 °C per 1 ora.

La digestione con enzimi di restrizione va condotta a 37 °C in una soluzione tampone (fornita insieme all'enzima dal produttore) che garantisce le condizioni ottimali (di salinità e pH) per la digestione. Il tempo di incubazione varia a seconda se si digerisce DNA genomico o frammenti di DNA corti (ad esempio un prodotto di PCR, come nel nostro caso). Nel primo caso la digestione richiede almeno 8 ore (o tutta la notte). Nel secondo caso sono sufficienti da 1-2 ore. Gli enzimi di restrizione sono reagenti costosi e delicati. Temono le contaminazioni (usare precauzioni nel prelevare l'enzima dalla soluzione stock) e l'inattivazione (si devono conservare a -20°C e, al momento dell'uso, mantenere sempre in un bagno di ghiaccio)

Risultato della consulenza genetica

La lettura del gel (fig. 3.13) conferma il genotipo eterozigote dei genitori e il genotipo omozigote recessivo di IV 3 (malato). IV 1 e IV 2 sono sani, IV 4 (il feto) è portatore di anemia falciforme.

Per saperne di più

METODI DI PRELIEVO DI MATERIALE FETALE PER POTER ESEGUIRE LA DIAGNOSI PRENATALE

Per diagnosi prenatale (DP) si intende l'insieme di indagini finalizzate a individuare nel feto la presenza di patologie di diversa origine (genetica, infettiva ecc.).
Tali tecniche comprendono:

- le ecografie e le ecotomografie;
- le indagini citogenetiche, cioè lo studio del cariotipo;
- le analisi sul DNA mediante tecniche di Genetica molecolare.

Le analisi sul DNA mediante le tecniche della Genetica molecolare possono essere effettuate su cellule fetali prelevate:

- dal liquido amniotico (AMNIOCENTESI);
- dai villi coriali (VILLOCENTESI);
- dal cordone ombelicale (FUNICOLOCENTESI);
- da altri tessuti del feto;
- dal sangue materno che può contenere DNA fetale (tecnica ancora da perfezionare).

Amniocentesi
L'amniocentesi (fig. 3.14) consiste nel prelievo di liquido amniotico mediante un ago sottile lungo fino a 15 cm, penetrando attraverso la parete addominale della madre con l'aiuto e la guida simultanea delle immagini ottenute per mezzo di un'ecografia. Il liquido contiene cellule che si sono sfaldate dall'embrione.
Questo prelievo non può essere effettuato prima della 15ª settimana ed è attualmente raccomandato a tutte le madri che abbiano superato i 35 anni.

Villocentesi
La villocentesi (fig. 3.15) consiste nel prelievo di un campione di tessuto appartenente ai villi coriali. I villi coriali sono estensioni digitiformi del corion che si sviluppano a partire dalla placenta verso lo spazio sanguigno materno che è posto nella parete dell'utero. In passato il prelievo era effettuato per via transcervicale, ossia mediante un sottile tubicino (catetere) o una pinza introdotta attraverso la vagina. Attualmente si preferisce la via transaddominale, cioè utilizzando un ago attraverso la parete addominale della madre. La villocentesi può essere effettuata già a partire dalla 9ª settimana.

Funicolocentesi
La funicolocentesi consiste nel prelievo di sangue fetale puro dal cordone (= funicolo) ombelicale per mezzo di un ago per via transaddominale e può essere effettuata solo a partire dalla 18ª settimana.

Tutte queste tecniche diagnostiche sono attualmente in rapido e notevole sviluppo; tuttavia comportano ancora alcuni rischi per la madre e per il feto, la cui incidenza è molto variabile in dipendenza delle metodologie utilizzate.
Rischi minori sono infezioni o emorragie, ma si possono verificare anche lesioni del feto.
La complicanza fetale più rilevante (aborto) si può avere in seguito al prelievo di villi coriali: ma poiché è molto difficile distinguere i casi di aborto spontaneo (che nelle donne con più di 35 anni può variare comunque dal 2% al 10,9%), non è possibile determinare con precisione il reale rischio legato a questa tecnica.

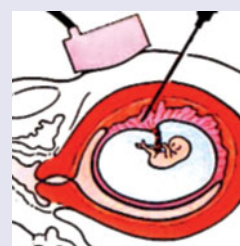
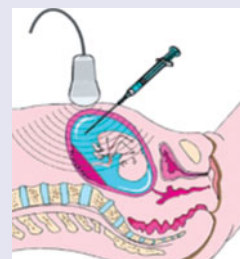



Figura 3.14
Tecnica di prelievo del liquido amniotico.

Figura 3.15
Tecnica di prelievo dei villi coriali. Un ago è inserito attraverso la parete addominale della madre per prelevare un campione di tessuto fetale dal corion.

4. Clonaggio del DNA: bianco o blu ?

Attraverso questo esperimento è possibile trasformare cellule di *Escherichia coli* con un plasmide "ricombinante" che contiene un inserto di DNA esogeno.

Le cellule batteriche trasformate con il plasmide ricombinante sono riconoscibili perché generano colonie bianche invece che colonie blu. Nella seconda parte dell'esperimento, attraverso l'estrazione del DNA plasmidico da colonie bianche e blu, la sua digestione con enzimi di restrizione e la separazione dei frammenti di DNA tramite elettroforesi su gel di agarosio, si potrà evidenziare e valutare la grandezza del segmento di DNA esogeno inserito nel plasmide.

Cosa vuol dire clonare?

La parola "**clone**" indica la "copia identica" di qualcosa e deriva dal greco ***klon***, che significa germoglio o ramoscello: infatti nei vegetali, a partire da un ramoscello, è possibile ottenere l'intera pianta. In Biologia si parla di clonaggio molecolare e di clonazione: nel primo caso si indica la possibilità di ottenere copie di un frammento di DNA di qualsiasi essere vivente; con il termine clonazione, invece, si intende la "duplicazione" di un intero organismo, possibilità che evoca spesso paure e fantasmi, abbondantemente sfruttati da cinema e letteratura. In realtà clonare un animale superiore è un procedimento complesso e di successo limitatissimo e la clonazione funziona meglio con gli organismi unicellulari (come nel caso di batteri adibiti a produzioni utili; ad esempio, i batteri ingegnerizzati per produrre insulina umana).

L'industria biotecnologica si basa spesso su microrganismi a cui si "insegna" a produrre sostanze utili, microrganismi che vengono modificati geneticamente e che, duplicandosi, "clonano" il gene estraneo in essi inserito.

Spesso per i ricercatori è molto utile avere numerose copie di singoli geni, perché in questo modo è possibile sequenziarli o utilizzarli come "sonde" per studiarne l'espressione in tessuti o in interi organismi. Alternativamente, è anche possibile rompere il genoma di un organismo, clonare i singoli frammenti e ottenere così le cosiddette **librerie** (***library***) nelle quali vengono conservati questi frammenti di DNA. Queste librerie (chiamate anche "genoteche") possono essere conservate in azoto liquido indefinitivamente e, successivamente, utilizzate per finalità specifiche.

Per clonare un gene si sfrutta la potenza e l'efficienza della capacità replicativa dei microrganismi. Se si riesce a inserire il gene di interesse in un batterio o in un lievito e lo si lascia replicare, otterremo molte copie del gene di partenza. Il problema è: come introduciamo questo gene? Alcuni microrganismi (come i batteri) hanno la capacità di assumere DNA dall'ambiente esterno, ma questo processo è raro e poco efficiente, senza contare che, se il DNA esogeno non si inserisce nel cromosoma batterico, non verrà tramandato alla progenie, rendendo il clonaggio impossibile.

Conoscenze propedeutiche

- Il dogma centrale della Biologia
- Cellule procariotiche ed eucariotiche
- I batteri
- Il genoma batterico e la sua organizzazione
- Gli operoni
- La riproduzione nei batteri
- La scoperta della trasformazione batterica
- Gli enzimi di restrizione

Per saperne di più

I PLASMIDI COME VETTORI DI CLONAGGIO

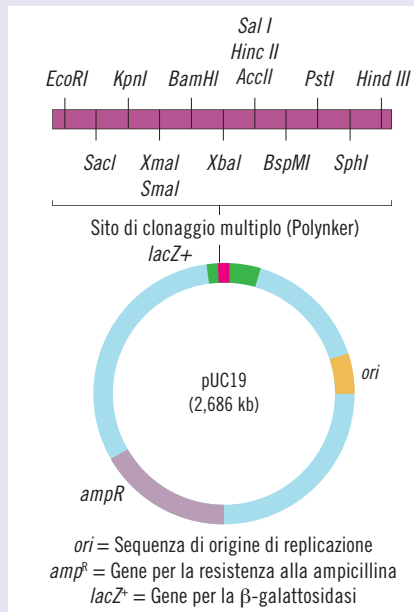



Figura 4.1
Il vettore di clonaggio pUC19. Questo plasmide possiede un'origine di replicazione (*ori*), un marcatore selettivo (*amp*^{R}) e un *polylinker* localizzato all'interno del gene *lacZ*$^+$ che codifica per la β-galattosidasi.

In questo esperimento utilizzeremo il **plasmide pUC19** (fig. 4.1), della cosiddetta serie pUC (p indica plasmide, UC sono le iniziali della University of California che ha messo a punto questo vettore di clonaggio; il numero che segue la sigla **pUC** indica il numero di serie del plasmide ingegnerizzato). I plasmidi pUC hanno dimensioni molto piccole e sono presenti nell'ospite batterico *E. coli* in un alto numero di copie, così da rendere agevole e facile la loro purificazione.
I plasmidi pUC contengono, come marcatore di selezione, il gene *amp*^{R}; una seconda forma di selezione permette di distinguere in modo facile e visivo (con un test colorimetrico detto "bianco o blu") le cellule di *E. coli* che sono state trasformate dal solo vettore (vettore non ricombinante) o dal vettore ricombinante che contiene il DNA esogeno.
Normalmente i plasmidi hanno DNA circolare a doppio filamento, anche se esistono dei plasmidi con DNA lineare. Come riportato in figura 4.2a, all'interno delle cellule di *E. coli* il DNA plasmidico si trova in una forma caratteristica, circolare a doppio filamento superavvolto intorno all'asse della doppia elica. Tale struttura viene chiamata "**struttura superavvolta**" e, essendo la struttura più stabile dal punto di vista termodinamico, è quella presente in natura.
In figura 4.2b si può osservare un'immagine al microscopio elettronico di molecole di DNA plasmidico superavvolte.

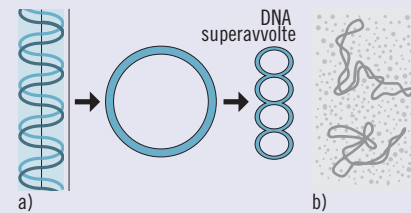
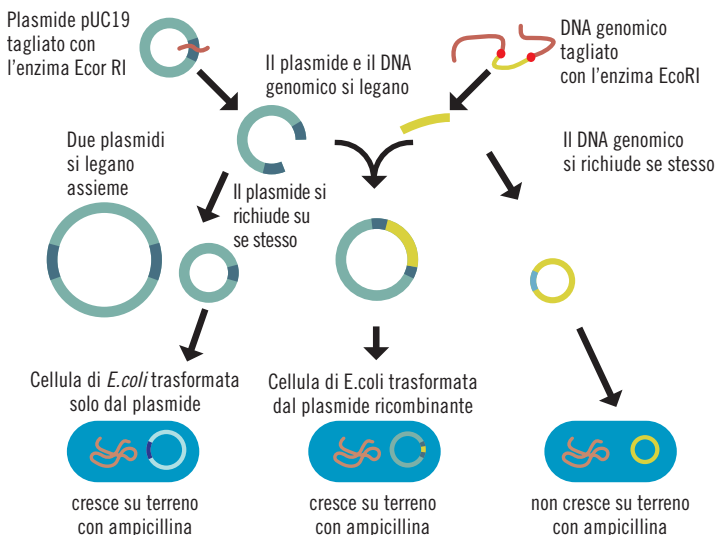



Figura 4.2
I plasmidi sono molecole di DNA circolari superavvolte. (a) Rappresentazione schematica di una molecola di DNA a doppio filamento (a sinistra); con struttura circolare (al centro) e superavvolta (a destra). (b) Fotografie al microscopio elettronico di DNA plasmidico superavvolto.

Figura 4.3
Formazione di diversi prodotti di ligazione e loro introduzione all'interno di cellule di *E. coli*.

Vengono così utilizzati dei **vettori di clonaggio**, come i **plasmidi**, in cui si inserisce il gene di interesse, generando così **vettori ricombinanti** che, successivamente, vengono introdotti all'interno del microrganismo.

Clonaggio molecolare

Il clonaggio di un gene è costituito da diverse tappe, qui di seguito riportate.

Costruzione del vettore ricombinante (vedi Esercitazione n.2)

1) **Taglio con enzima di restrizione:** dalle cellule che contengono il DNA da clonare, ad esempio cellule umane, viene estratto il DNA genomico e amplificato il gene (o frammento) di interesse (detto anche gene esogeno). I DNA esogeno e plasmidico vengono tagliati con lo stesso enzima di restrizione per generare estremità compatibili.

2) **Ligazione:** è un processo di saldatura tra frammenti di DNA che possono derivare anche da organismi molto distanti tra loro da un punto

di vista evolutivo, come batteri e uomo. La ligazione è una tappa indispensabile per effettuare il clonaggio molecolare e consente di formare **molecole di DNA ricombinante**. In presenza di un opportuno tampone, l'enzima **DNA ligasi** catalizza il legame covalente (legame fosfodiesterico) tra le due molecole di DNA. La molecola di DNA introdotta nel vettore viene spesso chiamata **inserto**.

I prodotti della reazione di ligazione possono essere molecole di diverso tipo (fig. 4.3):

- molecole ricombinanti vere e proprie (vettore + inserto);
- molecole di vettore che si è richiuso su se stesso senza aver incorporato l'inserto;
- molecole di solo inserto richiuse su se stesse;
- molecole di vettore che sono rimaste lineari e molecole ricombinanti contenenti più di un inserto (non illustrate nella figura).

Pertanto, quando si effettua un esperimento di trasformazione batterica con una miscela di ligazione, possono penetrare molecole diverse all'interno delle cellule batteriche. Tra queste, solo le molecole di vettore con struttura circolare, siano esse ricombinanti (cioè con inserto) oppure non ricombinanti (cioè senza inserto), danno luogo alla formazione di ceppi trasformati, capaci di crescere in terreno selettivo con antibiotico.

Trasformazione batterica con plasmidi ricombinanti

Alcuni batteri sono capaci naturalmente di assumere DNA dall'esterno e questa loro capacità è stata individuata, perfezionata e utilizzata dai ricercatori come il mezzo ideale per clonare molecole di DNA. Tuttavia, sono pochi i generi batterici che sono naturalmente trasformabili, quali *Streptococcus*, *Bacillus* e *Haemophilus*. Inoltre, in una popolazione di batteri, solo una frazione di cellule è trasformabile: tale proprietà prende il nome di **competenza**.

Per poter utilizzare *E. coli* in esperimenti di clonaggio molecolare si devono rendere "competenti" le sue cellule, per consentire al DNA del vettore di attraversare la parete e la membrana plasmatica e penetrare all'interno, dove può essere replicato e espresso.

Per rendere competenti le cellule di *E. coli* uno dei metodi più semplici consiste nel coltivare i batteri in terreno liquido, raccogliere le cellule mediante centrifugazione, risospenderle in una soluzione di $\mathbf{CaCl_2}$ fredda e mantenere la sospensione cellulare in ghiaccio per un certo tempo. Dopo questo trattamento le cellule di *E. coli* sono in grado di acquisire DNA a doppio filamento (come il DNA plasmidico, fig. 4.4). Non sono comprese del tutto le ragioni che rendono competenti le cellule di *E. coli*: si ipotizza che l'ingresso del DNA nelle cellule sia favorito dalla presenza degli ioni bivalenti positivi di Ca^{++}, che vanno a mascherare le cariche negative del DNA e a destabilizzare la membrana. Con tale procedura si ottengono efficienze di trasformazione dell'ordine di 10^5-10^6 trasformanti per microgrammo di DNA plasmidico, un valore più che sufficiente per molti scopi scientifici. Tuttavia, quando si effettua un esperimento di clonaggio molecolare tramite trasformazione, solo una piccola percentuale dei batteri viene trasformata, per cui è indispensabile poter distinguere le cellule batteriche

Per saperne di più — *ESCHERICHIA COLI*

Il batterio ***Escherichia coli*** (abbreviato in *E. coli*; il nome deriva da Theodor Escherich, medico e batteriologo tedesco che lo scoprì nel 1885) è un bacillo Gram-negativo e vive generalmente nell'apparato digerente degli organismi a sangue caldo. La maggior parte delle varietà di *E. coli* sono innocue, fanno parte della normale flora batterica intestinale e sono utili al loro ospite poiché producono la vitamina K2 e prevengono le infezioni di altri batteri patogeni. Alcune varietà, come quelle della serie O157:H7, possono contaminare i cibi e causare gravi avvelenamenti.

E. coli è stato il primo organismo modello per studi di Biologia molecolare e di Virologia batterica, specialmente per lo studio del batteriofago lambda.

I diversi tipi di batteri della specie *coli* e tutti gli altri simili che vivono sul terreno (nel suolo o in piante in via di appassimento) vengono raggruppati insieme sotto il nome di coliformi. Il "gruppo coliforme" comprende batteri Gram-negativi a forma di bastoncino (bacilli), aerobi e all'occorrenza anaerobi, che non formano spore e che fermentano il lattosio. I ceppi di *E. coli* sono spesso specie-specifici rispetto all'ospite, rendendo possibile determinare l'origine della contaminazione nell'ambiente. Per esempio, riconoscendo il tipo di *E. coli* che

contamina le acque possiamo capire se l'inquinamento è causato dall'uomo, da altri mammiferi o da uccelli.

Grazie alla versatilità e facilità di manipolazione, *E. coli* gioca un ruolo molto importante nella Biologia molecolare e nell'industria microbiologica. Si può affermare che le Biotecnologie nacquero negli anni settanta del secolo scorso grazie al lavoro di Stanley Norman Cohen e Herbert Boyer, i quali usando cellule di *E. coli*, plasmidi, enzimi di restrizione e ligasi crearono le prime molecole di DNA ricombinante. Una delle prime utili applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante è stata la produzione di insulina umana da parte di cellule di *E. coli* trasformate. Esiste comunque una limitazione: non si può far produrre a *E. coli* proteine complesse e con modificazioni post-traduzionali tipiche delle proteine eucariotiche.

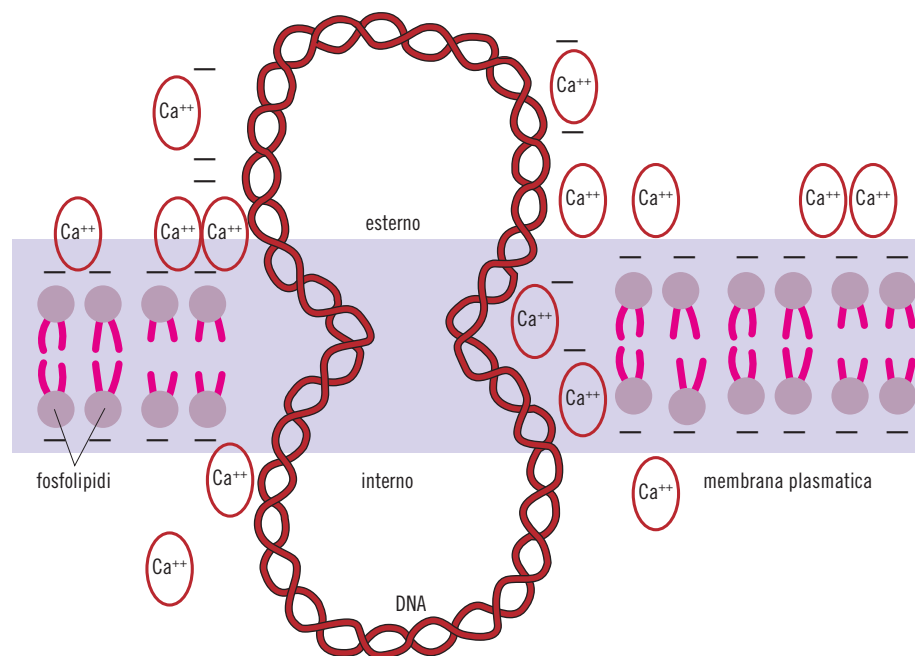



Figura 4.4
Membrana plasmatica di cellula batterica resa competente dal trattamento con $CaCl_2$ che permette il passaggio del DNA dall'esterno verso l'interno.
Le dimensioni del DNA e della membrana non sono in scala

trasformate da quelle non trasformate. Ciò è reso possibile ricorrendo all'uso dei cosiddetti "marcatori selettivi", come la resistenza ad alcuni antibiotici, una caratteristica che le cellule batteriche acquisiscono solo se hanno introdotto al loro interno il plasmide. Come verifica della competenza (il **controllo positivo** dell'esperimento), viene effettuata una trasformazione batterica con quantità note di pUC19. Tale controllo permette anche di calcolare l'**efficienza di trasformazione** nell'esperimento.
Bisogna inoltre verificare che la crescita delle cellule su terreno con antibiotico, dopo la trasformazione, sia dovuta all'acquisizione del vettore di clonaggio e non a una precedente caratteristica della popolazione batterica. Per fare ciò si effettua anche un **controllo negativo** in cui la miscela di ligazione è sostituita da acqua.
Tuttavia, come è possibile determinare se le cellule batteriche che crescono su un terreno contenente l'antibiotico contengono il plasmide ricombinante oppure quello non ricombinante? Esistono diversi modi, uno dei quali è illustrato nel paragrafo successivo e costituisce l'obiettivo della prima parte del nostro esperimento di laboratorio.

Per saperne di più

COLTIVAZIONE DI BATTERI IN LABORATORIO

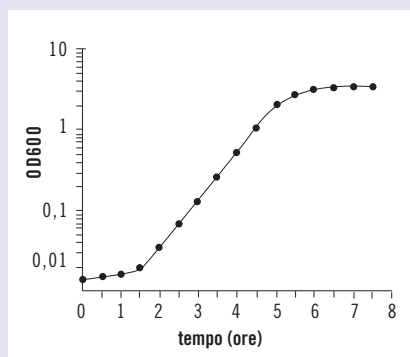



Figura 4.5
Curva di crescita di una popolazione batterica. In questa curva non è indicata la fase di morte. La crescita dei batteri viene determinata misurando allo spettrofotometro la densità ottica (OD), cioè l'assorbanza di una sospensione contenente i batteri a una lunghezza d'onda di 600 nm. L'asse delle ordinate è rappresentato in scala logaritmica.

Figura 4.6
Coltura dei batteri in terreno solido e in terreno liquido.

I **batteri** possono essere coltivati in laboratorio, facendoli crescere in opportuni terreni di coltura che contengono tutti quei materiali biologici o sintetici in grado di fornire un ambiente ottimale per la crescita di un particolare ceppo batterico. A tale scopo sono stati sviluppati centinaia di terreni di coltura diversi. I componenti dei terreni più comuni possono comprendere estratti di tessuti, di lieviti, peptone (derivato dall'idrolisi parziale di proteine) ecc. Questi composti sono chimicamente poco definiti, per cui i terreni che li contengono sono solitamente chiamati **terreni complessi**, o **massimi**. Spesso vengono però utilizzati terreni a composizione chimica ben definita, chiamati terreni sintetici, o definiti. A questi terreni si aggiungono spesso zuccheri, come ulteriore fonte d'energia.
Una tipica curva di crescita di una popolazione batterica è riportata in figura 4.5. Essa è caratterizzata da diverse fasi:

- una fase iniziale di adattamento (**fase "*lag*"**), in cui il numero di cellule aumenta molto lentamente;
- una fase di **crescita esponenziale** o logaritmica (**fase "*log*"**), in cui vi è attiva crescita;
- una **fase stazionaria**, in cui il numero di cellule rimane costante;
- una **fase di morte**, per esaurimento dei nutrienti o per accumulo di prodotti metabolici tossici.

I batteri possono crescere sia in **terreni solidi** che in **terreni liquidi** (fig. 4.6). Nel primo caso viene aggiunto al terreno liquido un agente gelificante come l'**agar**, un polisaccaride complesso che ad alta temperatura è liquido, ma che a temperatura ambiente determina la solidificazione del terreno. Sia in terreno liquido che in terreno solido la crescita ottimale dei batteri avviene in condizioni definite di temperatura, aerazione e pH.

Figura 4.7
Fasi di piastramento e crescita delle colonie.

In un terreno liquido è possibile seguire la crescita dei batteri sia contando direttamente il numero dei batteri al microscopio, sia misurando, con l'utilizzo di uno **spettrofotometro**, l'aumento della **torbidità della coltura** che è funzione del numero di batteri presenti nel terreno (fig. 4.5). Durante la fase esponenziale della crescita, le cellule di *E. coli* si dividono ogni 20 minuti circa. Aliquote di colture liquide di batteri possono essere distribuite (**piastrate**) su **capsule di Petri** contenenti terreno solido. Ogni batterio vitale si dividerà sul terreno fino a generare una colonia visibile a occhio nudo. In circa 12 ore (ossia incubando la piastra in un termostato a 37 °C *over night*, dalla sera alla mattina) ogni cellula di *E. coli* genera una colonia che contiene circa 10^7 cellule (figg. 4.6, 4.7 e 4.8).
Se si piastrano troppe cellule, le colonie finiranno per confluire una nell'altra e non saranno più distinguibili e contabili (figg. 4.6 e 4.8).

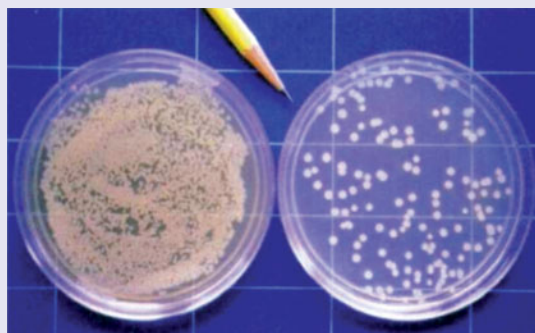
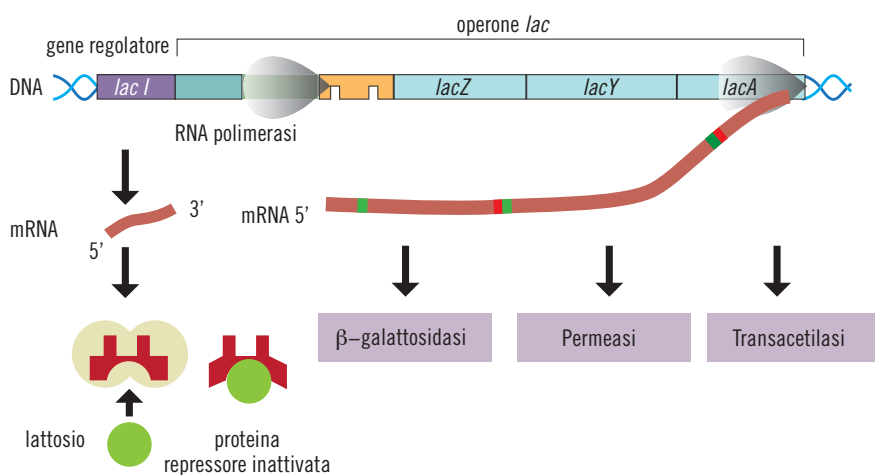



Figura 4.8
Crescita di batteri su un terreno solido (capsula di Petri) in funzione della densità di piastramento. Le colonie batteriche sono facilmente distinguibili e contabili solo piastrando quantità limitate di batteri (a destra), in caso contrario si ha una crescita confluente che non permette il conteggio (a sinistra).

Bianco o blu? Scopriamo se il clonaggio del gene ha avuto successo

Per distinguere le cellule batteriche che hanno acquisito il vettore con inserto (vettore ricombinante) da quelle che hanno acquisito il solo vettore (vettore non ricombinante) si allestisce un test colorimetrico (bianco o blu), per comprendere il quale è necessario conoscere il funzionamento dell'**operone lattosio (operone *lac*)** (fig. 4.9).

I batteri utilizzano per il loro metabolismo sostanze organiche, ad esempio, tra i carboidrati, il glucosio; quando nell'ambiente di crescita c'è a disposizione il lattosio invece del glucosio, si attivano in modo coordinato i **3 geni strutturali dell'operone lac** che codificano i seguenti enzimi:

- la β-galattosidasi (prodotta dal gene *lacZ*), enzima che idrolizza il legame β-glicosidico del lattosio convertendolo nei due monomeri (glucosio e galattosio) che verranno utilizzati dal batterio;
- la β-galattoside permeasi (prodotta dal gene *lacY*), una proteina di membrana che favorisce l'introduzione del lattosio all'interno della cellula mediante trasporto attivo;
- la tiogalattoside transacetilasi (prodotta dal gene *lacA*), che libera la cellula dai tiogalattosidi tossici importati insieme al lattosio.

- Questi tre geni sono trascritti solo se nel terreno di crescita è presente lattosio; infatti, l'espressione dell'operone lac è controllata da una proteina regolatrice nota come **repressore lac**, codificata dal gene regolatore *lacI* (fig. 4.10) situato a monte dei geni strutturali. Il repressore blocca la trascrizione dei tre geni strutturali quando non c'è lattosio disponibile, in quanto si lega a una sequenza, l'operatore, situata a monte dei geni strutturali e blocca l'accesso alla RNA polimerasi.

Come semplificato in figura 4.1, il vettore pUC contiene il gene selvatico (o *wild type*) lacZ che codifica la β-galattosidasi. Nel vettore il *polylinker*, cioè il sito di clonaggio in corrispondenza del quale avviene l'inserimento del DNA esogeno, è posizionato all'interno del gene lacZ.

Nei vettori ricombinanti in cui il frammento di DNA è inserito a livello del *polylinker* (fig. 4.11) il codice di lettura del gene della β-galattosidasi viene interrotto e, quindi, nelle cellule trasformate non può essere prodotta β-galattosidasi funzionale.

Se una cellula batterica viene trasformata dal solo plasmide pUC (cioè dal vettore di clonaggio non ricombinante), in presenza di **IPTG** (isopropiltiogalattoside, un analogo del lattosio che fa da induttore artificiale dell'operone lac) e di un substrato cromogeno della β-galattosidasi, come l'**X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside), la β-galattosidasi scinde l'X-gal in un prodotto precursore dell'indaco. Le colonie batteriche quindi

Figura 4.9
L'operone *lac* è regolato dalla proteina repressore, codificata dal gene *lacI*. In presenza di lattosio, il repressore perde l'affinità per la sequenza operatore (in giallo) e la RNA polimerasi può trascrivere i geni strutturali dell'operone.

Figura 4.10
In assenza di lattosio, il repressore si lega alla sequenza operatore (in giallo) e la RNA polimerasi non può trascrivere i geni strutturali dell'operone.

assumeranno un colore **blu**. Se nel gene *lacZ* del plasmide è stato inserito del DNA estraneo, le cellule batteriche trasformate non producono più la β-galattosidasi. Pertanto, in presenza di IPTG e di X-gal nel terreno di coltura, l'X-gal non viene trasformato nel precursore dell'indaco. Di conseguenza, le colonie batteriche trasformate con il vettore ricombinante saranno **bianche** (fig. 4.11).

L'esperimento

Per eseguire la prima parte dell'esperimento scaricate le schede del protocollo di laboratorio che riguardano l'attività 1 "Bianco o blu?"

Risultati ed interpretazione

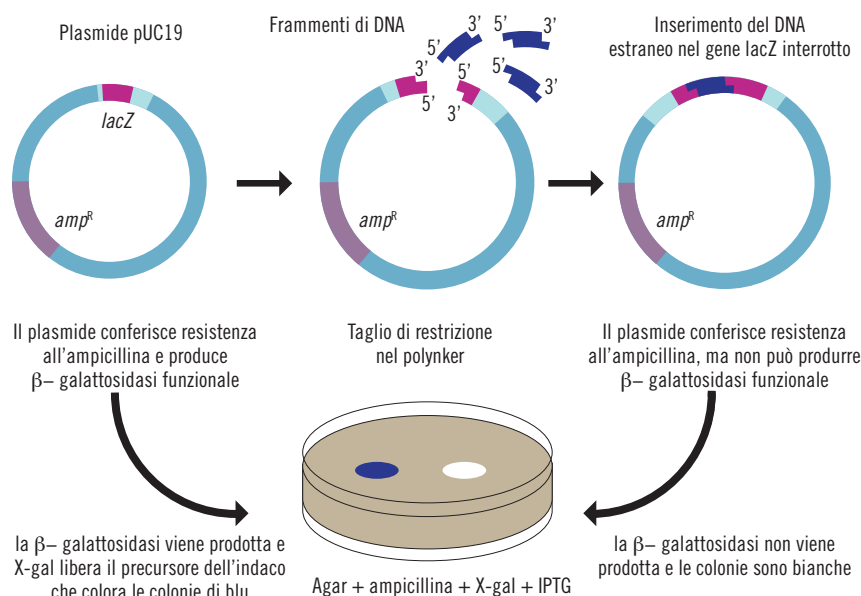
Il ceppo di *E. coli* utilizzato (XL1 Blue) è costituito da cellule batteriche mutanti (*lacZ*⁻), cioè che non producono β-galattosidasi endogena e ampicillina-sensibili (*amp*ˢ), cioè non in grado di formare colonie in un terreno contenente l'antibiotico ampicillina. Esso acquisisce la capacità di crescere in presenza di ampicillina solo se trasformato con il vettore che porta come marcatore di selezione il gene per la resistenza all'ampicillina. Pertanto, il risultato atteso, dopo trasformazione, è il seguente:

	Ceppo batterico XL1 Blue trasformato con		
	miscela di ligazione	pUC19 (controllo pos.)	acqua (controllo neg.)
crescita colonie	+	+	-
colore colonie	Bianche, blu	Solo blu	-

+ = presenza di colonie - = assenza di colonie

Le cellule che crescono su ampicillina hanno pertanto acquisito il vettore. Quanto al colore delle colonie, esse saranno solo blu se i batteri sono stati trasformati con pUC19; alcune bianche e alcune blu, se la trasformazione è stata effettuata con la miscela di ligazione.

RICOMBINANTE O NON RICOMBINANTE? LA PROVA MOLECOLARE DELLA PRESENZA DELL'INSERTO DI DNA NEL PLASMIDE

In base a quanto detto precedentemente, è ragionevole supporre che le cellule batteriche bianche siano state trasformate dal vettore ricombinante. Non vi è ancora, tuttavia, la dimostrazione formale che ciò sia vero. Per ottenere tale dimostrazione bisogna estrarre il DNA plasmidico dalle cellule trasformate e, mediante l'utilizzo dello stesso enzima di restrizione usato per la creazione del plasmide ricombinante, verificare la presenza del frammento di DNA esogeno che si voleva clonare. Ad esempio, se l'obiettivo era clonare un segmento di DNA umano generato dopo taglio con l'enzima di restrizione *EcoRI*, una volta recuperato il DNA plasmidico dalle cellule di una colonia bianca, il taglio con *EcoRI* di tale DNA dovrebbe generare due frammenti: uno delle dimensioni del vettore pUC19 e l'altro corrispondente al segmento di DNA umano in esso inserito.

La seconda parte dell'esperimento consiste proprio in questo:

- estrazione del DNA plasmidico
- analisi di tale DNA mediante taglio con enzima di restrizione e separazione elettroforetica dei frammenti di DNA ottenuti.

Figura 4.11
Nella piastra in basso nella figura è indicata a sinistra una colonia blu che deriva da una cellula trasformata dal plasmide senza l'inserto. In presenza dell'induttore IPTG e del substrato cromogeno X-gal, le cellule producono l'enzima e formano una colonia di colore blu. A destra, crescita di una colonia trasformata dal plasmide con il gene esogeno inserito all'interno del gene *lacZ*: non producendo ß-galattosidasi le cellule sono bianche. Sia le colonie blu che le bianche sono resistenti all'ampicillina.

L'esperimento

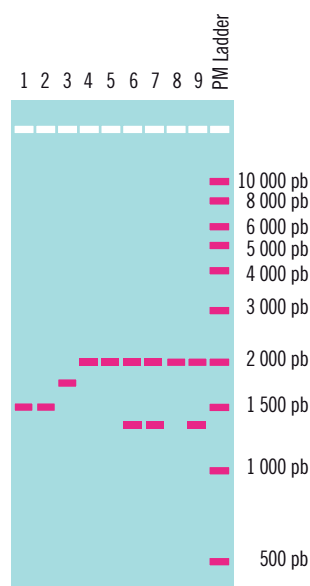
Scaricate le schede del protocollo dell'attività 2 "ricombinante o non ricombinante".

"Miniprep" di DNA plasmidico da cellule di *E. coli*

Nei laboratori di ricerca per purificare il DNA plasmidico da cellule di *E. coli* trasformate si utilizzano delle procedure rapide di estrazione (genericamente chiamate mini-preparazioni o **miniprep** di DNA plasmidico), che permettono di valutare il risultato di un esperimento di clonaggio in tempi molto brevi (poche ore). Quando si estrae il DNA plasmidico con una miniprep, si ottiene un DNA che non è puro, cioè in soluzione non è presente solo DNA plasmidico, ma sono presenti anche altri tipi di molecole. Oltre a proteine, lipidi e zuccheri, vi sono

Grazioli, Gritti, Plevani, Viale STUDENTI IN LABORATORIO © Zanichelli 2012

Figura 4.12
Immagine sperimentale della miscela di frammenti (PM Ladder) utilizzata come marcatore di peso molecolare nell esperimento schematizzato in figura 4.13.

Fig. 4.13
Schema del risultato del gel dell'esperimento. Vedi il testo per la descrizione dei campioni analizzati nelle corsie 1-9 e PM Ladder.

molecole di RNA. Le molecole di RNA, essendo spesso più piccole, hanno una mobilità elettroforetica maggiore del DNA plasmidico (cioè in un gel di agarosio "corrono" di più). Esse sono quindi visibili nella parte bassa del gel; per evitare queste impurità a una miniprep di DNA plasmidico, prima della corsa elettroforetica, viene normalmente aggiunto l'enzima *RN*asi che degrada specificamente le molecole di RNA, che quindi non risultano più visibili su gel.

Digestione con un enzima di restrizione

Dopo aver isolato il DNA plasmidico tramite miniprep, lo digeriamo con un opportuno enzima di restrizione (*vedi* capitolo 3 "Sano o malato?") per verificare la presenza dell'inserto di DNA.
Il vettore plasmidico pUC19 contiene un unico sito di restrizione *EcoRI* nella zona del *polylinker*. Il taglio del vettore non ricombinante con l'enzima di restrizione *EcoRI* trasformerà, quindi, le molecole di DNA circolari del vettore in molecole lineari. Se, invece, il vettore pUC19 contiene un inserto di DNA esogeno clonato nel sito *EcoRI*, il taglio del vettore ricombinante con l'enzima di restrizione genererà due molecole di DNA lineari, una che corrisponde al vettore pUC19 linearizzato e l'altra che corrisponde al frammento di DNA inserito. Dopo elettroforesi si osserveranno quindi due bande, una corrispondente al vettore, l'altra corrispondente all'inserto. Mediante elettroforesi è possibile, pertanto, determinare sia la presenza che la dimensione del DNA clonato.

Marcatori di peso molecolare utilizzati

In questo esperimento si utilizzano due diversi tipi di marcatori di peso molecolare (fig. 4.13): uno per il DNA con struttura circolare (che serve per controllare il peso molecolare del DNA plasmidico estratto da una singola colonia batterica trasformata) e uno per il DNA con struttura lineare (che serve per determinare la dimensione dell'inserto). Come marcatore di peso molecolare di DNA con struttura circolare è stato utilizzato il plasmide pUC19, che è costituito da 2686 pb (paia di basi).
Come marcatore di peso molecolare di DNA con struttura lineare viene utilizzata una miscela di frammenti di DNA ottenuti digerendo il DNA di diversi plasmidi con enzimi di restrizione adatti al fine di generare 13 frammenti, con un intervallo di dimensioni che va da 0,25 a 10,0 Kb. I frammenti di 3,0 e di 1,0 Kb sono un po' più abbondanti per servire da bande di riferimento (fig. 4.12).

Risultati e interpretazione

Il gel viene caricato secondo questo schema:

- nel pozzetto 1 viene caricato pUC19 come marcatore di DNA con forma circolare;
- nei pozzetti 2 e 3 vengono caricati rispettivamente i DNA plasmidici estratti da una colonia blu e da una colonia bianca, non digeriti con *EcoRI* e forniti dal laboratorio; questi servono da controllo;
- nei pozzetti 4, 5, 6, 7 quattro studenti caricano i DNA plasmidici purificati da a partire da colonie bianche o blu;
- nel pozzetto 8 viene caricato il DNA estratto da colonia blu e digerito con *EcoRI*;
- nel pozzetto 9 viene caricato il DNA estratto da colonia bianca e digerito con *EcoRI*;
- nell'ultimo pozzetto viene caricato il PM, Ladder di DNA lineare, a peso molecolare noto.

Il risultato del gel di agarosio è riportato nella figura 4.13.

Nella prima corsia c'è una banda di DNA del plasmide pUC19 nella sua struttura di DNA superavvolto.
Nella seconda corsia c'è il DNA estratto da una colonia blu. Poiché le colonie blu contengono il plasmide pUC19 (non ricombinante), si osserva una banda della stessa dimensione di quella del pUC19 di riferimento.
Nella terza corsia c'è il DNA estratto da una colonia bianca. Il DNA ricombinante ha una dimensione maggiore rispetto al DNA della colonia blu perché contiene il DNA esogeno.
Dalla corsia 4 alla 7 troviamo i campioni caricati dagli studenti: in questo gel, ad esempio, gli studenti hanno estratto e digerito DNA plasmidici da due colonie blu (4 e 5) e due da colonie bianche (6 e 7).
Nella corsia 8 c'è il DNA di controllo del vettore plasmidico pUC19 linearizzato mediante taglio con enzima di restrizione *EcoRI*.
Nella corsia 9 c'è il DNA del vettore ricombinante, tagliato con *EcoRI*. Si osservano 2 bande: la più alta è il vettore plasmidico; la più bassa è l'inserto di DNA esogeno.
Le bande indicate in figura per i pozzetti 1, 2 e 3 corrispondono alla posizione del DNA plasmidico superavvolto e nei pozzetti 8 e 9 al plasmide in forma linearizzata. Notare che il plasmide in forma superavvolta migra più velocemente dello stesso plasmide linearizzato.

5. Mais blu: dal fenotipo al genotipo

L'esperimento che viene illustrato riguarda l'osservazione dei fenotipi di plantule di mais e l'analisi a livello molecolare del loro genotipo per verificare la segregazione degli alleli di un gene responsabile della sintesi di antociani, potenti antiossidanti naturali che conferiscono un colore blu-violetto a diversi tessuti della pianta.

In una prima parte, insegnanti e studenti si occupano della semina e germinazione di semi di mais, per verificare nelle plantule (le giovani piantine nei primi stadi di sviluppo) i rapporti fenotipici attesi secondo le leggi di Mendel. In laboratorio gli studenti procedono all'estrazione del DNA dalle foglie e dalle radici, e alla amplificazione tramite PCR di una sequenza marcatore associata al gene responsabile della sintesi di antociani, e verificano i genotipi a livello molecolare.

Geni indipendenti e geni associati

I geni localizzati su cromosomi non omologhi sono chiamati **geni indipendenti**, in quanto segregano indipendentemente durante la meiosi (seconda legge di Mendel, fig. 5.1a).
Mendel lavorò con caratteri (geni) che mostravano segregazione indipendente.
I geni situati sulla stessa coppia di cromosomi omologhi sono detti **geni associati** e non mostrano un assortimento indipendente, cioè i loro alleli tendono a essere ereditati insieme. Vengono separati solo se tra loro interviene un evento di ricombinazione (*crossing-over*), la cui frequenza è proporzionale alla distanza dei *loci* considerati.
Due geni associati si definiscono associati *in cis* quando su un cromosoma si trovano gli alleli dominanti dei due geni e sul cromosoma omologo i due alleli recessivi; si definiscono associati *in trans* quando sullo stesso cromosoma si trovano l'allele recessivo di un gene e l'allele dominante dell'altro gene (fig. 5.1b).

I marcatori

Un allele che determina un fenotipo riconoscibile (ad esempio i caratteri analizzati da Mendel) è considerato un **marcatore genetico classico**, in quanto consente di seguire la trasmissione nelle generazioni di un determinato gene e del cromosoma su cui è localizzato. I marcatori genetici servono per costruire le mappe genetiche, che sono rappresentazioni figurate della posizione dei geni su un cromosoma.
Negli anni ottanta e novanta del secolo scorso è avvenuta una rivoluzione tecnologica nel campo della Genetica. Sono stati, infatti, identificati altri tipi di marcatori, riconoscibili tramite tecniche

Figura 5.1
Geni indipendenti e associati.
a) I due geni A e B localizzati su cromosomi diversi (a sinistra) segregano in modo indipendente.
b) Due geni A e B quando si trovano sullo stesso cromosoma (a destra) sono associati.

Conoscenze propedeutiche

- La struttura del DNA
- La replicazione del DNA
- Dal DNA al cromosoma
- La genetica mendeliana
- Le definizioni di genotipo e fenotipo, allele, *locus* genetico
- L'elettroforesi
- La PCR

Figura 5.2
Cromosoma 1 dell'uomo:
a) distribuzione dei geni e dei marcatori del DNA lungo il cromosoma;
b) distanze in cM;
c) alcuni dei marcatori con le relative sigle;
d) mappa citogenetica del cromosoma.

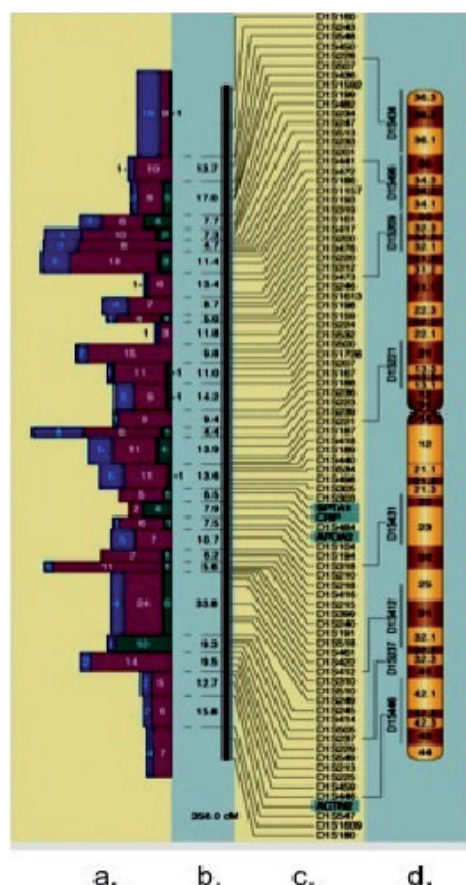
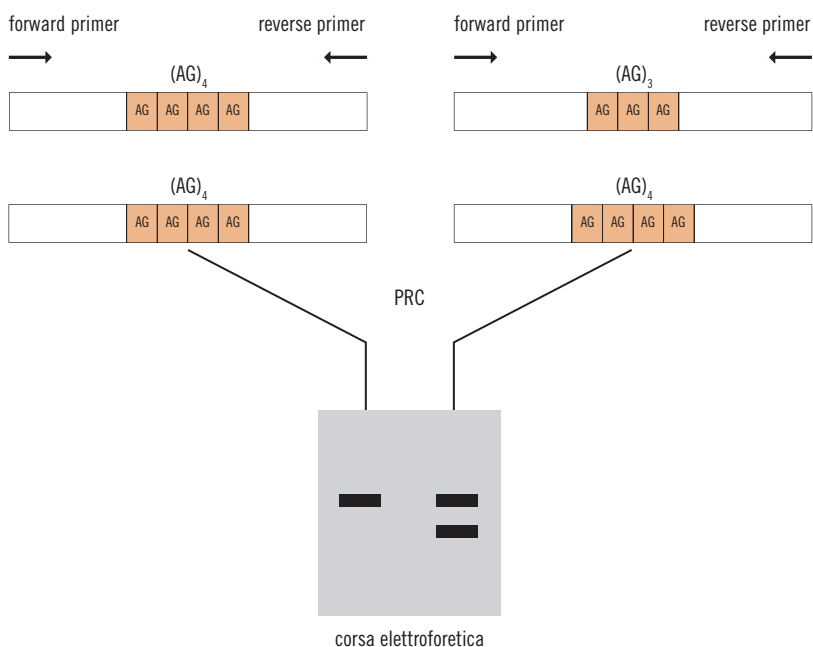



Figura 5.3
Esempio di analisi di un microsatellite tramite amplificazione con PCR ed elettroforesi su gel. A sinistra un individuo omozigote che mostra un'unica banda elettroforetica corrispondente a un frammento con 4 ripetizioni; a destra un individuo eterozigote che mostra due bande elettroforetiche corrispondenti a frammenti di 3 e 4 ripetizioni.

di analisi del DNA, che hanno dato un forte impulso alla costruzione di mappe genetiche più dettagliate e precise: i **marcatori molecolari del DNA**, sequenze nucleotidiche presenti nel genoma, che mostrano elevato polimorfismo, cioè differenze evidenziabili tra gli individui. Il sequenziamento del genoma umano ha consentito la localizzazione di molti siti polimorfici, distribuiti in tutti i cromosomi, per lo più nelle sequenze non codificanti. Questa variabilità può riguardare anche una singola base: in questo caso si parla di SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). I marcatori microsatelliti, chiamati anche STR (*Short Tandem Repeat*), sono costituiti da corte sequenze (1-5 paia di basi) ripetute n volte, localizzate in 10^2-10^4 posizioni diverse (e fisse) nel genoma. Gli STR presentano un elevato grado di polimorfismo all'interno della popolazione, in quanto il numero di ripetizioni può essere diverso da individuo a individuo. Questo tipo di polimorfismo è un polimorfismo di lunghezza: i diversi alleli, cioè, differiscono per il numero di ripetizioni, e quindi hanno lunghezze diverse (per una descrizione più dettagliata dei polimorfismi del DNA, *vedi* Esercitazione 1).

I marcatori molecolari seguono le stesse regole di ereditabilità dei geni.

I marcatori molecolari sono numerosissimi e consentono quindi di costruire mappe molto dettagliate dei cromosomi (fig. 5.2).

I genetisti hanno sviluppato metodi efficaci e rapidi per identificare i marcatori molecolari.

Il numero di ripetizioni di un STR può essere evidenziato con la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizzando una coppia di *primer* (*forward e reverse*) per innescare la reazione di amplificazione, "disegnati" su regioni fiancheggianti il tratto di interesse (fig. 5.3).

I prodotti dell'amplificazione, analizzati tramite elettroforesi su gel, evidenziano il polimorfismo sotto forma di segmenti di DNA di diverso peso molecolare che permettono di rilevare le differenze alleliche tra gli individui.

Se un gene d'interesse, difficile da identificare fenotipicamente, è posizionato vicino a un marcatore molecolare (cioè se i due *loci* sono strettamente associati), il marcatore molecolare, salvo ricombinazione, è ereditato insieme all'allele di interesse (fig. 5.4). Invece di analizzare la trasmissione di questo allele, si può più facilmente analizzare la trasmissione del marcatore molecolare ad esso associato.

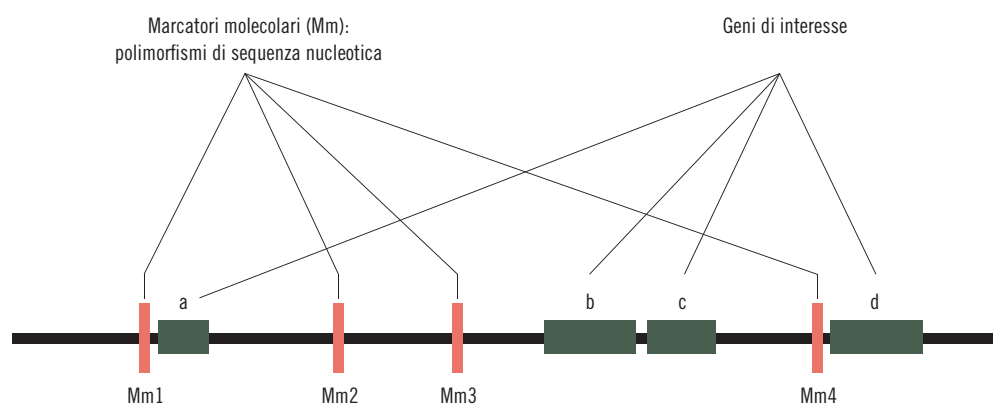



Figura 5.4
Per studiare la trasmissione del gene "a" si può utilizzare il marcatore molecolare Mm1; per il gene "d" si può usare Mm4. Invece non ci sono marcatori sufficientemente associati ai geni "c" e "b" per essere utilizzati.

Il mais

I cereali rappresentano per l'uomo la più importante fonte rinnovabile di cibo, foraggio e materie prime per l'industria. È per questo motivo che la ricerca sui cereali è oggetto di una rinnovata attenzione da parte del settore biotecnologico. In particolare, la comprensione dei fenomeni che caratterizzano lo sviluppo e i processi che portano all'accumulo dei nutrienti di riserva nel frutto (o **cariosside**) possono fornire le basi per il miglioramento della resa e della qualità dei cereali. Tra i cereali, il mais (fig. 5.5) riveste particolare importanza sia nell'alimentazione animale sia nell'utilizzo dei suoi derivati nell'industria; infatti, come prodotto alimentare zootecnico, può essere considerato l'alimento base, e in molti casi indispensabile, per la preparazione delle razioni animali.

Il mais, per la sua particolare fisiologia, è una delle piante più efficienti nel trasformare l'energia solare ed è anche una delle più plastiche per quanto riguarda la possibilità di cambiare le caratteristiche produttive in funzione delle condizioni ambientali e delle esigenze umane. I primi a coltivare il mais furono le popolazioni meso Americane. A partire dal 1500 la sua coltivazione si è diffusa anche negli altri continenti, dove il mais si è adattato alle più svariate condizioni climatiche, ed è oggi nel mondo la terza coltura per importanza dopo il frumento e il riso. A livello mondiale occupa più di 150 milioni di ettari di suolo e fornisce una produzione di circa 800 milioni di tonnellate di **granella** (l'insieme delle cariossidi ottenute dalla sgranatura delle spighe).

Le rese medie per ettaro variano notevolmente: dalle 1.5-1.8 tonnellate nei paesi in via di sviluppo, alle 7-8 tonnellate nei paesi sviluppati. La resa unitaria media italiana è prossima a 10 tonnellate.

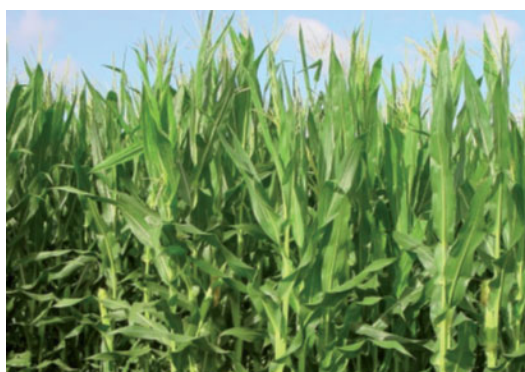



Figura 5.5
Un campo di mais.

Inoltre, il mais è una delle **specie modello** più utilizzate per studiare il ruolo dei geni nelle vie biosintetiche e nella morfogenesi delle piante. Infatti, per le sue dimensioni e per l'abbondanza di tessuti nell'embrione, nelle foglie e nelle spighe, le procedure di dissezione sono più semplici e consentono di ottenere grandi quantità di materiale per le analisi biochimiche e molecolari.

Le due caratteristiche della pianta di mais che hanno più aiutato gli studi genetici sono: la dimensione della spiga, detta comunemente e impropriamente pannocchia, e lo sviluppo di infiorescenze maschili e femminili distinte (fig. 5.6).

Una normale pianta di mais produce spighe con circa 400-700 semi. Le piante da loro derivate possono essere facilmente incrociate o autofecondate, producendo una progenie numerosa particolarmente utile negli studi genetici.

La localizzazione dei fiori maschili nel pennacchio e dei fiori femminili nella spiga consente, inoltre, di evitare contaminazioni con polline indesiderato, semplicemente incappucciando l'infiorescenza femminile, senza dover procedere all'emasculazione, che consiste nella rimozione dell'infiorescenza maschile.

I frutti che si formano dopo la fecondazione sono

Figura 5.6
Morfologia della pianta di mais:
a) infiorescenza maschile (pennacchio);
b) infiorescenza femminile (spiga).

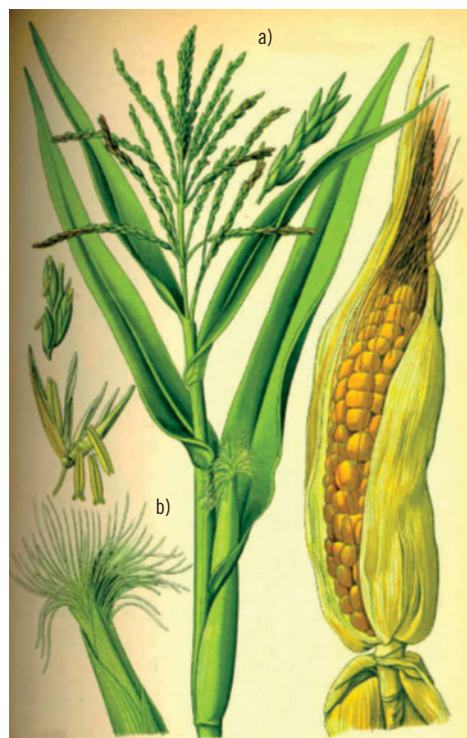



Figura 5.7
Struttura della cariosside di mais.

pericarpio
aleurone
endosperma
scutello
coleottile
plumula
ipocotile
radichetta
coleoriza
embrione

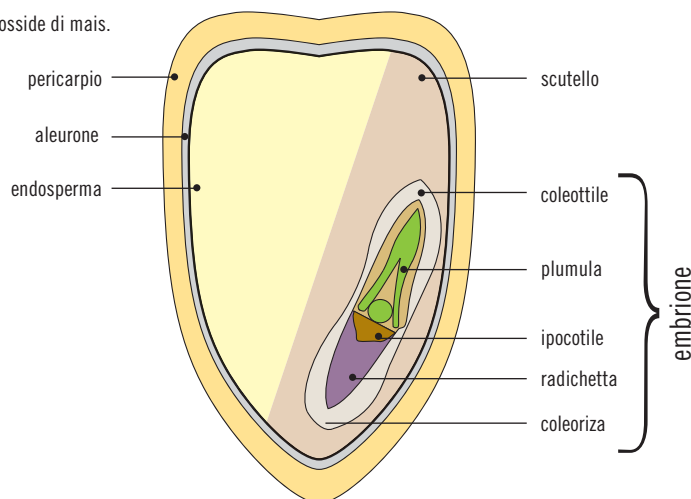
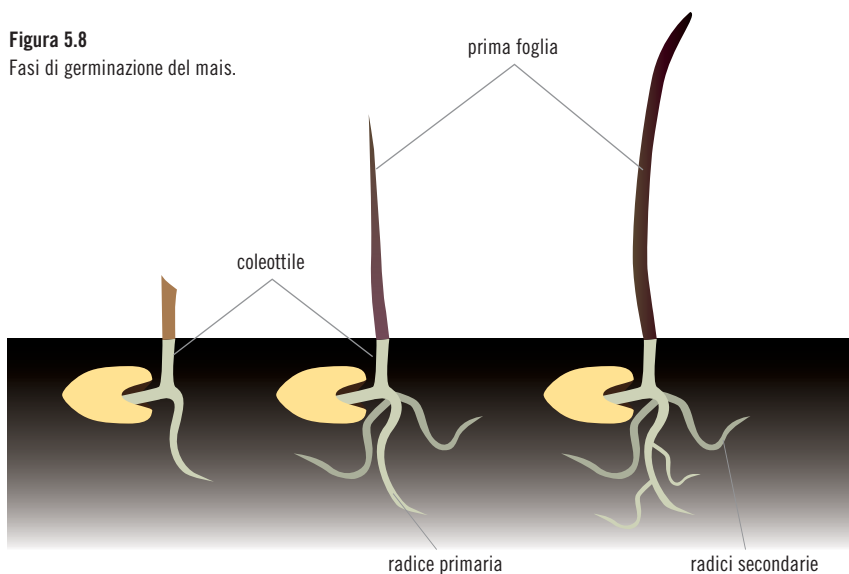



Figura 5.8
Fasi di germinazione del mais.

chiamati cariossidi, e sono avvolti da un sottile rivestimento (**pericarpo**) molto aderente al seme che proteggono: è quindi improprio considerare il chicco di mais come un seme, è in realtà un intero frutto (fig. 5.7).

La cariosside è costituita dall'**embrione** che deriva dalle divisioni dello zigote (2n), dall'**endosperma**, un tessuto di riserva ricco di numerose sostanze tra cui amido e proteine, e dall'**aleurone**, uno strato esterno ricco in proteine.

La percentuale di acqua in un seme è bassissima e, grazie a ciò, il seme si trova in uno stato di quiescenza che gli permette di resistere alle condizioni più avverse e gli dà la capacità di germinare anche a distanza di anni.

Nell'embrione si possono già riconoscere una **radichetta** avvolta da una membrana (**coleoriza**) e un fusticino (**ipocotile**), che porta, nel caso delle monocotiledoni (come il mais), una foglia o cotiledone e termina con una gemma apicale, **plumula** o piumetta, protetta da un'altra membrana (il **coleottile**). Il cotiledone è detto **scutello**: contiene sostanze di riserva (soprattutto grassi e proteine) e ha funzione di assorbimento delle sostanze di riserva dell'endosperma.

La germinazione del seme (fig. 5.8) comincia con la re-idratazione; successivamente, l'embrione comincia a crescere, nutrito dalle sostanze di riserva. La radichetta cresce più rapidamente, è la prima a emergere dal tegumento del chicco formando la radice primaria: altre radici avventizie si svilupperanno più tardi. Quindi, si forma una struttura tubulare chiusa che cresce fino alla superficie del suolo: la plumula protetta dal coleottile. Appena emerge smette di allungarsi, si apre ed espone le foglie arrotolate che ha all'interno. Il fusto inizierà ad allungarsi solo dopo che la pianta avrà raggiunto un'altezza di parecchi centimetri. L'unico cotiledone resta interrato.

La biosintesi dei flavonoidi

Tra i pigmenti che determinano la varietà di colori nelle piante, i **flavonoidi** rappresentano una classe di molecole che vengono sintetizzate e esclusivamente nelle **piante vascolari**.

Si tratta generalmente di sostanze idrosolubili che la cellula conserva nel vacuolo: la loro comune struttura è data da un anello a 15 atomi di carbonio (fig. 5.9). Sulla base della loro struttura chimica i flavonoidi sono classificati in diversi gruppi, tra cui le antocianidine, dette anche antociani.

Ai flavonoidi sono attribuite diverse funzioni come

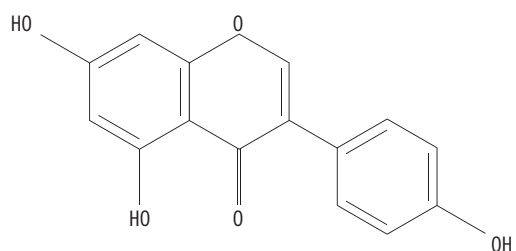



Figura 5.9
Struttura di un flavonoide.

Figura 5.10
Frutti freschi il cui colore è dovuto alla presenza di flavonoidi.

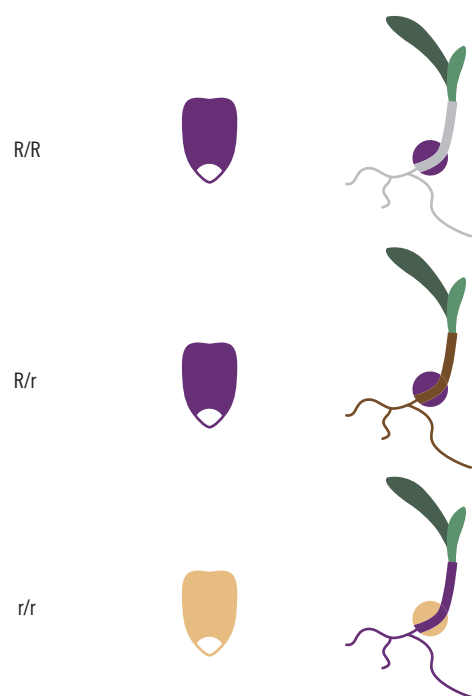



Figura 5.11
Tessuto specificità degli alleli *R* e *r*.
Genotipo *R/R*: cariosside colorata e radice incolore;
genotipo *R/r*: cariosside colorata e radice colorata;
genotipo *r/r*: cariosside gialla e radice colorata.

ad esempio:

- le colorazioni rosso e viola dovute alle antocianidine (fig. 5.10);
- un ruolo fondamentale nei processi di impollinazione affidata agli insetti e nella dispersione dei semi;
- una grande capacità antiossidante: è noto che cibi ricchi di queste sostanze, come ad esempio fragola, spinaci, mirtillo, vino rosso, possono migliorare il decorso dell'invecchiamento neuronale, nonché opporsi all'azione dannosa dei radicali liberi sul DNA e avere un effetto protettivo sul sistema cardiovascolare.

I pigmenti antociani sono caratteri facilmente e prontamente distinguibili; inoltre, non essendo legati al metabolismo primario della pianta, è possibile ottenere dei mutanti vitali con alterazioni della sintesi e conseguente fenotipo riconoscibile. Dato il loro benefico effetto, è evidente l'interesse nella selezione di varianti ricche di antociani.

La biochimica e la genetica della sintesi degli antociani sono state ampiamente studiate negli ultimi decenni. Ad oggi, sono stati isolati una ventina di geni strutturali coinvolti in questa via biosintetica. Nel mais, sono stati studiati i fattori di trascrizione che attivano la via biosintetica degli antociani nei diversi tessuti e in momenti appropriati dello sviluppo. Tra questi il gene R1 (*colored* 1) presenta un elevato numero di alleli che determinano una diversa distribuzione del pigmento nelle varie parti della pianta e della cariosside. In particolare, in questa attività di laboratorio sono analizzati gli **alleli codominanti**:

- **R**, che determina l'accumulo di pigmento nell'aleurone (fig. 5.11) e quindi la cariosside colorata;
- **r**, che determina la colorazione di alcuni tessuti della pianta (in particolare le radici).

I marcatori molecolari in agricoltura

Come abbiamo detto, i marcatori molecolari permettono di seguire la trasmissione di alleli specifici e possono essere utilizzati per mappare caratteri di interesse (figg. 5.2 e 5.4). L'identificazione di marcatori associati a un *locus* genico responsabile di un carattere d'interesse consente di selezionare le piante per quel carattere, in base all'analisi degli alleli polimorfici del marcatore ritrovabili nella popolazione, senza ricorrere a prove in campo.

In generale nelle piante di interesse agrario, e nel mais in particolare, molti caratteri importanti dal

Storia della scienza

I TRASPOSONI

Figura 5.12
Spighe di mais di diverse varietà. Alcune presentano colorazione non omogenea della cariosside.

Lo studio dei pigmenti nelle piante e della loro determinazione genetica ha attirato l'attenzione dei genetisti da lungo tempo. Mendel, per lo studio della trasmissione dei caratteri, si avvalse di differenze nella pigmentazione del fiore e dei cotiledoni del seme in piante di piselli da giardino. Negli anni cinquanta del secolo scorso Barbara McClintock, lavorando sui geni degli antociani nel mais, notò inserzioni, delezioni e traslocazioni di sequenze specifiche associate a variazioni di colore delle cariossidi nelle pannocchie che attribuì allo spostamento di elementi genetici, definiti **trasposoni**, da un punto all'altro del genoma. In un'epoca in cui si riteneva che il genoma fosse assolutamente stabile, la scoperta di Barbara McClintock, che le meritò il premio Nobel nel 1983, fu dirompente. Oggi il sequenziamento completo del genoma di diversi organismi animali e vegetali ha messo in evidenza la massiccia presenza di milioni di copie di elementi genetici mobili nella quota di DNA extragenico. È impressionante sapere che quasi metà del genoma umano è costituito da vari tipi di elementi trasponibili, che hanno in comune la capacità di spostarsi, anche se con modalità diverse, all'interno del genoma. L'elemento trasponibile più frequente nel genoma umano è la sequenza Alu, lunga circa 300 basi e presente in 300 000-1 000 000 di copie. Gli elementi genetici mobili rappresentano una enorme fonte di variazione genetica, i cui effetti sono ancora largamente sconosciuti.
I trasposoni si ritrovano in tutti gli organismi viventi, a partire dai batteri: la loro storia evolutiva e i loro effetti sulla evoluzione sono oggetto di ricerca e studio.

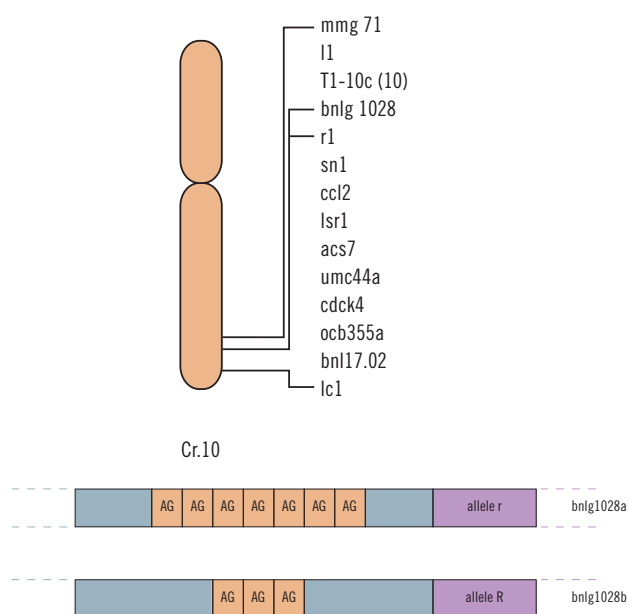



Figura 5.13
In alto il cromosoma 10 di mais e la posizione dei *loci* concatenati *r1* e *bnlg1028* sul braccio lungo.
In basso, schema dei microsatelliti bnlg1028a e bnlg1028b associati rispettivamente agli allei r e R (il numero di ripetizioni è indicativo).

punto di vista economico presentano una variabilità di tipo continuo che dipende dalla segregazione mendeliana di molti geni. Si tratta di caratteri quantitativi (**QTL**, ***Quantitative Trait Locus***). È pertanto difficile separare l'effetto di un singolo *locus* influenzante un QTL da quello di altri che influenzano lo stesso carattere. I marcatori molecolari permettono di trattare i QTL come singoli fattori mendeliani semplici e di selezionare ognuno di questi fattori separatamente.
I marcatori molecolari possono essere utili anche nel caso in cui si desideri combinare in un'unica progenie due geni differenti che concorrono alla determinazione di un dato fenotipo, per ottenere un fenotipo potenzialmente migliorato. Anche in questo caso, invece di analizzare la trasmissione dei geni di interesse, il genetista può, più facilmente, analizzare la trasmissione di marcatori molecolari ad essi associati.

I marcatori molecolari associati al gene R1

Il marcatore molecolare STR utilizzato in questa attività di laboratorio è stato scelto dalla mappa "*SSR consensus map*" del Maize Genetics and Genomics Database (Maize-GDB, http://www.maizegdb.org/). Esso è localizzato vicino al gene R1 (circa 1 cM = centiMorgan) sul braccio lungo del cromosoma 10 (fig. 5.13). Il marcatore **bnlg1028 ha due forme alleliche**: **bnlg1028a** associato all'allele r è costituito da un numero di ripetizioni di nucleotidi superiore rispetto a **bnlg1028b** associato all'allele R.

Il nostro esperimento

Impostazione del problema

In questa esercitazione si confronteranno i risultati ottenuti con la Genetica classica con quelli della Genetica molecolare, utilizzando come organismo sperimentale il mais. Partendo da semi di mais ottenuti autofecondando piante eterozigoti R/r si andrà a verificare a livello fenotipico e molecolare il rapporto 1:2:1, atteso in una popolazione F2 dalla segregazione di due alleli codominanti.

Secondo la Genetica classica, si potrà verificare la segregazione degli alleli R e r direttamente contando le plantule con i tre diversi fenotipi ottenute dalla germinazione dei semi (fig. 5.14); e applicando un test statistico noto come test del χ^2 si valuterà la affidabilità dei risultati osservati.

La segregazione di questi due alleli potrà essere seguita anche utilizzando il marcatore molecolare **bnlg1028 nei suoi due alleli a e b** (fig. 5.15). Amplificando con la PCR il *locus* bnlg1028 e analizzando su gel i prodotti dell'amplificazione sarà possibile individuare e discriminare in maniera univoca (a meno dei rari ricombinanti, **R/bnlg1028a** e **r/bnlg1028b**) i tre fenotipi/ genotipi presenti:

- R/R: seme colorato, radice incolore, una sola banda bassa;
- R/r: seme colorato e radice colorata, due bande, una alta e una bassa;
- r/r: seme incolore, radice colorata, una sola banda alta (fig. 5.16).

Operativamente, bisogna far germinare i semi; dalla foglia e dalla radichetta delle plantule verrà estratto il DNA genomico, che sarà amplificato con la PCR utilizzando una coppia di *primer* specifica per il marcatore bnlg1028.

Per eseguire l'esperimento scaricate i protocolli che comprendono anche le istruzioni per seminare le cariossidi di mais.

Estrazione del DNA

Per estrarre il DNA dai nuclei delle cellule vegetali, si devono prima rompere (lisare) le pareti cellulari (ricordate che le cellule vegetali, a differenza delle cellule animali, possiedono una parete), le membrane plasmatiche e le membrane nucleari; ciò viene effettuato ponendo il cam-

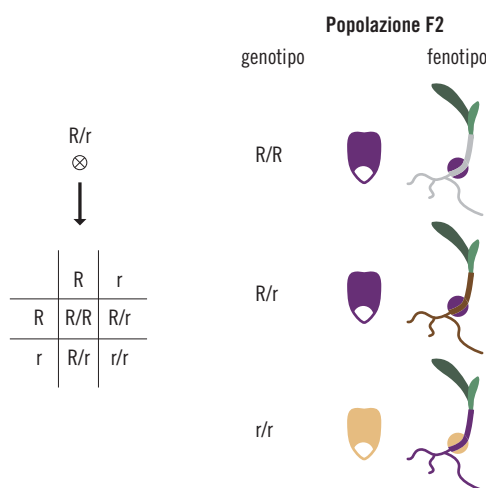



Figura 5.14
Genotipi e relativi fenotipi di una popolazione F2 segregante per il gene R1 in mais. Il simbolo ⊗ indica autofecondazione.

Figura 5.15
Autofecondazione di un ibrido e segregazione del gene R1 associato al marcatore molecolare bnlg1028.

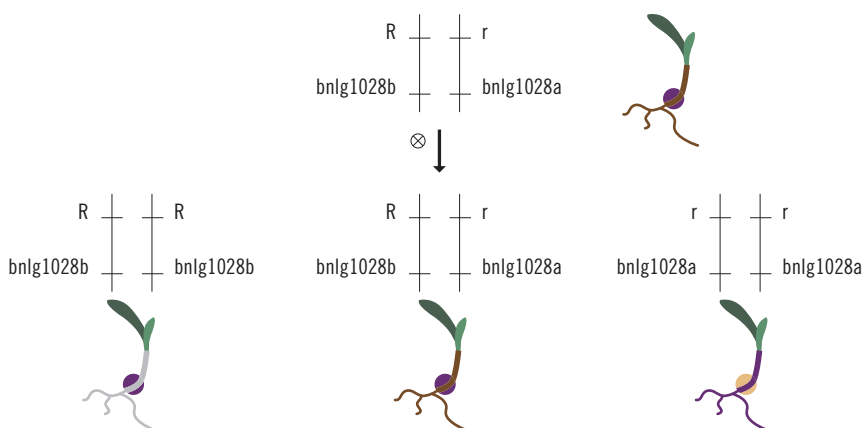
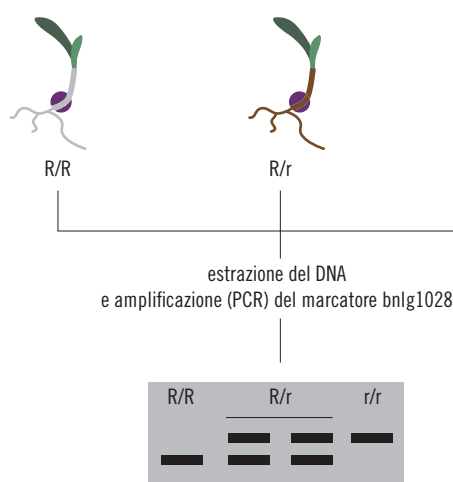



Figura 5.16.
Profili elettroforetici attesi dai tre genotipi della popolazione segregante, analizzando il marcatore molecolare bnlg1028 associato al gene R1.

pione in una soluzione omogeneizzante-lisante contenente un detergente che facilita la rottura della parete e delle membrane; utilizzando un omogeneizzatore il DNA si libera nella frazione solubile.
In alcuni casi, per esempio se il campione è rappresentato da semi secchi, è richiesta un'azione meccanica preliminare, come la triturazione per ridurre la matrice di partenza in piccole parti.
Poiché il DNA è associato alle proteine istoniche, l'aggiunta di un sale, come il cloruro di sodio (NaCl), facilita la separazione del DNA dalle proteine. Dopo centrifugazione, nel supernatante saranno presenti DNA, RNA, proteine, polisaccaridi e lipidi. L'aggiunta di enzimi, quali proteinasi e ribonucleasi, facilita la digestione rispettivamente, delle proteine (istoniche e non istoniche) e dell'RNA.
Bisogna ora eseguire la precipitazione del DNA, che avviene con l'aggiunta di isopropanolo. Il DNA è insolubile in isopropanolo: il DNA precipita sotto forma di filamenti gelatinosi bianchi.
La soluzione verrà poi centrifugata e il precipitato di DNA, risospeso in acqua distillata sterile o in una opportuna soluzione tampone, sarà pronto per le successive analisi.

Analisi dei risultati

Verifica della segregazione del gene R1

Il test del χ^2 (Chi quadrato) è un test di significatività statistica, uno strumento indispensabile nel confrontare due gruppi o popolazioni riguardo ad un parametro. Si tratta di confrontare una serie di valori osservati e di valori attesi, per stabilire se concordano fra loro.
Nel nostro esempio, su 180 plantule, nate dall'incrocio Rr x Rr, si sono osservate 41 RR (cariosside scura, radice bianca), 97 Rr (cariosside e radice scure) e 42 rr (cariosside chiara e radice scura) come viene riportato in tabella 5.1.
Ci dobbiamo chiedere se la differenza tra i valori di segregazione osservati e quelli teorici-attesi in base al rapporto di segregazione genotipica di 1:2:1 (valori teorici attesi 45:90:45) è statisticamente significativa oppure no. È un po' come lanciare una moneta: su 100 lanci è difficile ottenere il rapporto teorico atteso di 50 volte testa e 50 volte croce. Su 100 lanci si possono, ad esempio, ottenere 48 testa e 52 croce, ossia i valori osservati sono diversi da quelli attesi. Se la differenza non è significativa, vuol dire che è dovuta solo al caso. Se la differenza risultasse significativa, come ad esempio nel caso di 10 testa e 90 croce, vorrebbe dire che ci sono stati dei fattori di disturbo, ad esempio le due facce della moneta non solo uguali e ciò impedisce la casualità dei risultati. Ci sono tuttavia una serie di valori intermedi, ad esempio 30 testa e 70 croce, per i quali è difficile stabilire, senza l'impiego di test statistici, se la differenza tra valori osservati ed attesi è significativa o no.

GENOTIPO	VALORI OSSERVATI	VALORI ATTESI
R/R	41	45
R/r	97	90
r/r	42	45
Totale	180	180

Tabella 5.1
Esempio di segregazione F2 su un campione di 180 plantule.

In questi casi si rende indispensabile l'utilizzo di un test statistico come il test del χ^2.
Dall'applicazione della formula

$$\chi^2 = \sum \frac{(o\text{-}a)^2}{a}$$

dove **o** sta per fenotipi osservati e **a** sta per fenotipi attesi, si ottiene che il valore del χ^2 è un misura della differenza complessiva fra le due serie di valori

Nel nostro caso:
$\chi^2 = 16/45 + 49/90 + 9/45=$
$0,35 + 0,54 +0,20 = 1,09$.

Il valore ottenuto va confrontato con quelli in tabella 5.2, nella riga corrispondente a df = 2, dove df = *degrees of freedom* (gradi di libertà), pari a (numero di fenotipi —1) e quindi a (3—1).
Con 2 gradi di libertà si possono accettare valori fino a 4,60, per cui il valore 1,09 è più che accettabile: infatti è collocato tra i valori di probabilità p 0,70 e 0,50, cioè vi è una probabilità superiore al 50% e inferiore al 70% che la differenza osservata sia dovuta al caso. Di norma sono accettati valori di $p > 0,05$.
N.B: Come regola generale, perché un test del χ^2 sia svolto correttamente, è necessario che il campionamento sia assolutamente casuale (nel nostro caso la scelta dei semi o cariossidi F2) e l'analisi sia fatta su una popolazione di almeno 50 individui.

Probabilità= p

df	0,95	0,90	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,016	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,71	1,39	2,41	3,22	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,42	2,37	3,67	4,64	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,71	1,06	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,15	1,61	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,64	2,20	3,83	5,35	7,23	8,56	10,65	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,13
9	3,33	4,17	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,87	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59

accettare ⟵ | ⟶ rifiutare

a livello di 0,05

df= gradi di libertà cioè n° di fenotipi -1

Tabella 5.2
Analisi statistica dei risultati genetici. Il test del χ^2. Il valore p indica la probabilità che la differenza tra valori osservati e valori attesi sia dovuta al caso.

Interpretazione dei risultati della corsa elettroforetica

La figura 5.17 mostra una schema dei risultati della corsa elettroforetica: l'ordine di caricamento dei campioni è indicativo dato che è possibile "caricare" il gel con un ordine diverso da quello indicato nell'esempio (pb= paia di basi).

- **PM**: marcatore di peso molecolare che si separa in bande di peso molecolare (lunghezza in pb) noto;
- **corsia 1**: banda bassa associata all'allele R: campione di DNA genomico estratto da plantula a seme colorato e radice incolore e quindi omozigote R/R;
- **corsia 2**: banda alta associata all'allele r: campione di DNA genomico estratto da plantula a seme incolore e radice colorata e quindi omozigote r/r;
- **corsia 3**: presenza di entrambe le bande: campione di DNA genomico estratto da plantula a seme colorato e radice colorata e quindi eterozigote R/r;
- **corsia 4**: bianco di PCR (campione contenente le stesse soluzioni e gli stessi tamponi utilizzati, ma che non contiene DNA). Serve per dimostrare l'assenza di DNA contaminante durante tutte le fasi di lavoro.

L'assenza di bande nel bianco di PCR (corsia 4) dimostra che gli amplificati sono specifici e che non c'è stato "inquinamento" da parte di altro DNA. Le bande di diverso peso molecolare permettono di "seguire" gli alleli R e r, e quindi i fenotipi/ genotipi, nella popolazione segregante.

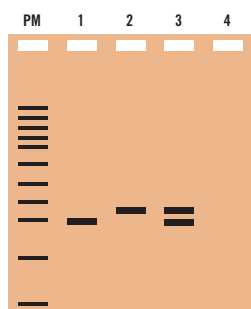



Figura 5.17
Schema del gel ottenuto dopo la corsa elettroforetica.

6. Analisi cromosomiche

Lo scopo di questo laboratorio è di rendere familiari le metodologie usate in Citogenetica umana per lo studio dei cromosomi, guidando gli studenti nell'osservazione e nell'interpretazione di situazioni normali o patologiche.

La Citogenetica è l'area della Genetica che studia i cromosomi. Ogni specie è caratterizzata da un determinato assetto, vale a dire da un insieme specifico di cromosomi il cui numero e struttura vengono mantenuti costanti attraverso le generazioni

Il cariotipo umano

L'insieme completo di tutti i cromosomi metafasici di una cellula è definito **cariotipo**; il cariotipo è specie-specifico e quello umano normale diploide è costituito da **46 cromosomi** (22 paia di **autosomi** e un paio di **cromosomi del sesso** o **eterocromosomi**: XX nella femmina, XY nel maschio).

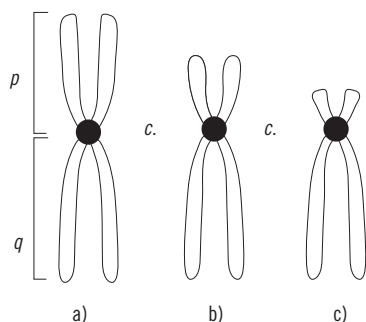



Figura 6.1
Diversi tipi morfologici di cromosoma:
a) metacentrico
b) submetacentrico
c) telocentrico
(p, braccio corto; q, braccio lungo; c, centromero).

Classificazione e nomenclatura dei cromosomi

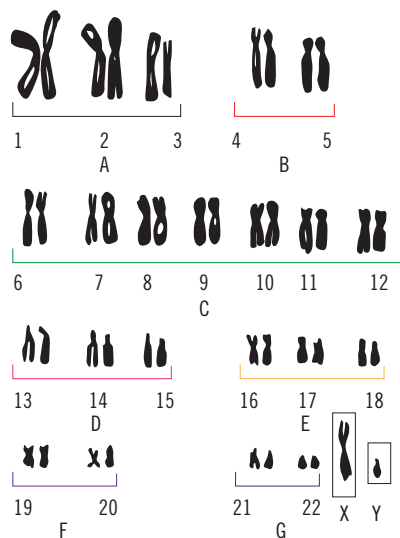
La **ricostruzione del cariotipo** o **mappa cromosomica** viene effettuata attraverso la costruzione del cariogramma, ottenuto appaiando i cromosomi metafasici omologhi e ordinandoli secondo un sistema di classificazione internazionale:

- la posizione del centromero, che è una caratteristica costante nella morfologia dei cromosomi, è utile per la loro classificazione: se il centromero ha una posizione centrale, il cromosoma è definito **metacentrico** (fig. 6.1a);
- se è localizzato non esattamente in posizione mediana, il cromosoma è definito **submetacentrico** (fig. 6.1b);
- se, infine, il centromero è localizzato all'estremità del cromosoma, questo è definito **acrocentrico** (fig. 6.1c).

Secondo la **classificazione di Denver**, proposta nel 1960 al Congresso di Genetica Umana tenutosi in Colorado, i cromosomi umani esaminati in mitosi sono classificati e ordinati in base alla loro lunghezza e alla posizione del centromero.
I cromosomi sono stati suddivisi in 7 gruppi (fig.

Conoscenze propedeutiche

- La struttura della doppia elica del DNA
- La modalità di replicazione del DNA
- L'organizzazione strutturale della cromatina
- L'eucromatina e l'eterocromatina
- I processi di divisione cellulare (mitosi e meiosi), con particolare attenzione al comportamento dei cromosomi durante tali eventi

Figura 6.2
Cariogramma di cromosomi metafasici umani ordinati secondo la classificazione di Denver. Nella presentazione grafica del cariotipo, il cromosoma X viene normalmente affiancato al cromosoma Y o all'altro cromosoma X separatamente dagli altri cromosomi del gruppo C.

6.2), in ordine decrescente di lunghezza:

- gruppo A (coppie 1, 2 e 3);
- gruppo B (coppie 4 e 5);
- gruppo C (coppie da 6 a 12 e cromosoma X);
- gruppo D (coppie 13, 14 e 15);
- gruppo E (coppie 16, 17 e 18);
- gruppo F (coppie 19 e 20);
- gruppo G (coppie 21 e 22);
- cromosoma Y.

Nell'uomo i cromosomi 1, 3, 16, 19 e 20 sono metacentrici, i cromosomi 13, 14, 15, 21, 22 e Y sono acrocentrici e gli altri sono submetacentrici.
Soltanto alla fine degli anni sessanta del secolo scorso, con l'introduzione delle tecniche di bandeggio, è diventato possibile classificare e identificare singolarmente tutte le 23 coppie di cromosomi.
Successivamente al 1960 si sono accumulate informazioni su diverse aberrazioni numeriche e strutturali dei cromosomi. Nella Conferenza Internazionale di Genetica Umana di Chicago del 1966, e in seguito nella Conferenza di Parigi del 1971, è stata definita una nomenclatura standard per le varie aberrazioni cromosomiche: venne proposto di aggiungere alla nomenclatura originale di Denver una serie di simboli per indicare sia alcune caratteristiche del cariotipo normale che le aberrazioni cromosomiche.
Per convenzione, i cariotipi normali si rappresentano in modo sintetico come segue:

- 46, XX (individuo di sesso femminile);
- 46, XY (individuo di sesso maschile).

Alcuni dei simboli comunemente usati sono:

- /: una linea diagonale indica la presenza di un mosaicismo (Vedi Per saperne di più "Mosaici"); per esempio, 46/47 indica che l'individuo in esame presenta due linee cellulari, una con 46 cromosomi, l'altra con 47;
- + e –: questi segni indicano la presenza di un cromosoma soprannumerario (+) o la mancanza di un cromosoma (–) o di una parte di cromosoma (es. 47, XX, +21 indica un individuo di sesso femminile con un cromosoma 21 soprannumerario).

La ricostruzione del cariotipo, ovvero il passaggio dal cariotipo al cariogramma, è rappresentata in figura 6.3. A sinistra è presentata una metafase come appare al microscopio (cariotipo), al centro e a destra la ricostruzione (cariogramma) di un cariotipo maschile e femminile, rispettivamente, con i diversi cromosomi appaiati.

I bandeggi

Un'identificazione inequivocabile di ogni cromosoma del cariotipo umano è stata possibile grazie a tecniche di trattamento e colorazione dei cromosomi denominate **bandeggi**.
Intorno al 1970, infatti, sono state introdotte metodiche di colorazione dei cromosomi che utilizzano sostanze in grado di colorare specifiche regioni (**bande**) in modo più evidente di altre. Il bandeggio che ne deriva è specifico e costante per ogni coppia di cromosomi omologhi e permette di ricostruire il cariogramma, evidenzian-

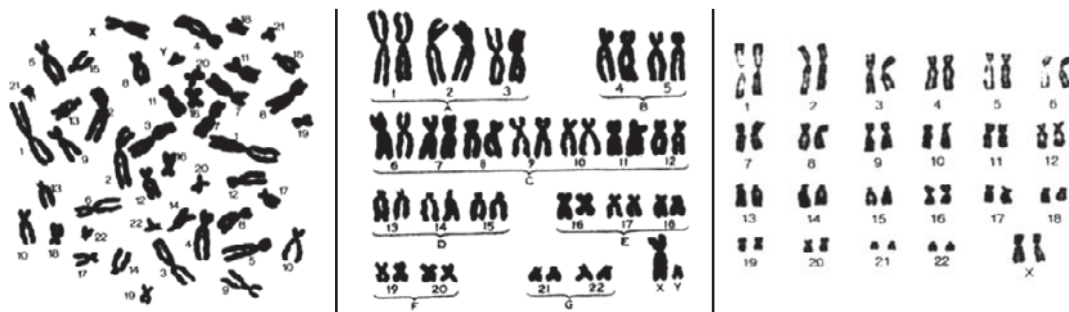
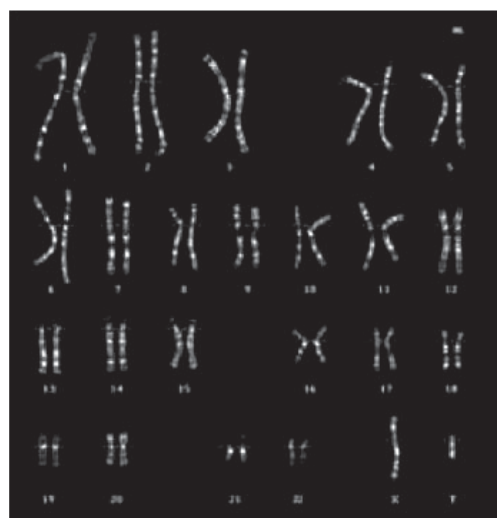



Figura 6.3
Dal cariotipo al cariogramma.

a)

b)

Figura 6.4
Bandeggio di cromosomi umani:
a) le bande Q si ottengono con la tecnica di bandeggio con Quinacrina
b) le bande G si ottengono con la tecnica di bandeggio con Giemsa.

do anche eventuali anomalie cromosomiche sia di numero che di struttura.
Esistono diversi tipi di bandeggi. Il **bandeggio Q**, ottenuto mediante l'impiego di un colorante fluorescente, la **Q**uinacrina, consiste in un'alternanza di regioni intensamente fluorescenti e di regioni buie. Le bande più luminose corrispondono a zone ricche in Adenina e Timina (fig. 6.4a).
Il **bandeggio G**, ottenuto col colorante **G**iemsa e con tripsina, è caratterizzato da un'alternanza di bande chiare e scure (fig. 6.4b). Le bande chiare corrispondono a regioni caratterizzate da attività trascrizionale, replicazione precoce e basso contenuto di DNA ripetuto. Le bande più scure corrispondono a zone ricche in Adenina e Timina, relativamente povere di geni, e risultano quindi corrispondenti e sovrapponibili alle bande luminose Q. Il potere di risoluzione di questo tipo di colorazione è alquanto grossolano: infatti, una banda citogenetica ha una dimensione media di circa 5 Mb (5 milioni di basi) e può contenere centinaia di geni.
Il **bandeggio R** (**reverse**) è ottenuto mediante denaturazione al calore e opportuna colorazione; le bande scure corrispondono a zone ricche in Citosina e Guanina.

Patologia cromosomica

Nel corso degli anni le tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo si sono sempre più raffinate e oggi è possibile individuare alterazioni strutturali anche di piccole dimensioni. Si è sviluppata così una area della Patologia umana denominata **Patologia cromosomica**.

Alcune applicazioni dell'analisi citogenetica nella Patologia cromosomica sono:

- diagnosi prenatale di sindromi associate ad anomalie cromosomiche;
- diagnosi postnatale di anomalie cromosomiche in individui portatori di sindromi o di malattie genetiche;
- studio citogenetico delle cellule tumorali: identificazione di cromosomi "marcatori" e mappaggio di regioni subcromosomiche che contengono geni associati allo sviluppo o alla progressione tumorale.

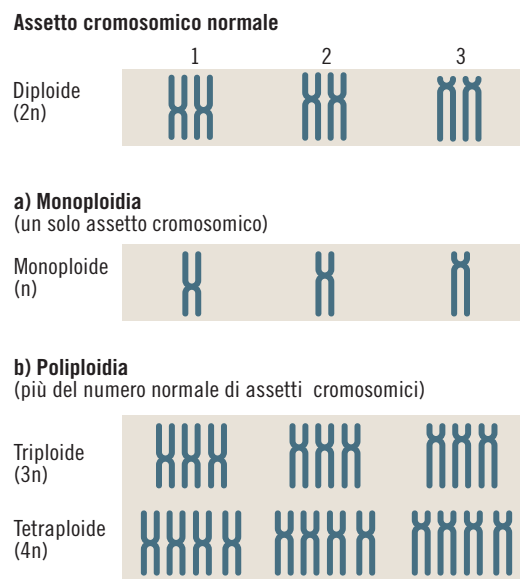
Variabilità cromosomica normale

Il genoma umano presenta una grande variabilità genetica a livello molecolare; tale variabilità ha riscontri anche a livello citogenetico quando coinvolge tratti di DNA dell'ordine di milioni di basi. Molta di questa variabilità riguarda l'eterocromatina, inerte dal punto di vista genetico, e pertanto perlopiù senza effetti fenotipici.
Si tratta, quindi, di una variabilità normale che a livello di eterocromatina può manifestarsi sotto forma di varianti morfologiche, e precisamente:

- variazioni di lunghezza di zone pericentromeriche, soprattutto dei cromosomi 1, 9, 16 e Y;
- variazioni di lunghezza dei bracci corti dei cromosomi acrocentrici, con presenza di satelliti o assenza totale del braccio corto.

Variabilità cromosomica patologica

Una qualsiasi anomalia del cariotipo umano normale (46, XX o 46, XY) ha spesso come conseguenza una patologia, di gravità variabile.

Figura 6.5
Anomalie numeriche: monoploidie e poliploidie.

Le anomalie sono generalmente il risultato di errori durante la gametogenesi (non-disgiunzione dei cromosomi omologhi o rotture cromosomiche seguite da una riorganizzazione degli stessi in combinazioni anomale), ma possono verificarsi anche al momento della fecondazione o nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Le rotture dei cromosomi si verificano in modo casuale, pertanto a livello teorico sono possibili numerosissime anomalie; di fatto, solo una minima parte sono compatibili con la vita.

Le anomalie cromosomiche si possono distinguere in due gruppi: **anomalie numeriche** e **di struttura**.

Anomalie numeriche

Ogni assetto cromosomico corrispondente esattamente a un multiplo dell'assetto aploide n di una specie è definito **euploide**; in particolare, quelli superiori a 2n sono detti **poliploidi** (triploidi 3n, tetraploidi 4n ecc.) (fig. 6.5).

Nell'uomo la presenza di una triploidia (fig. 6.6) è di fatto incompatibile con la vita, in quanto determina nel 99% dei casi un aborto spontaneo, e nell'1% dei casi la morte precoce dei neonati entro il primo mese di vita (l'incidenza della triploidia è 1/10 000 nati).

Figura 6.6
Cariotipo triploide.

Le triploidie (3n) si originano in seguito alla fecondazione di un singolo ovulo da parte di due spermatozoi (fig. 6.7a) o a errori della meiosi, sia femminile (fig. 6.7b) sia maschile (fig. 6.7c), con formazione di gameti in cui non è avvenuta la riduzione del numero o ancora, meno frequentemente, per la mancata espulsione del globulo polare durante la gametogenesi femminile.

Si definisce invece **aneuploide** qualunque numero di cromosomi che non sia un multiplo esatto di n: i casi più comuni sono rappresentati dalle **trisomie**, con presenza di un cromosoma soprannumerario, vale a dire un corredo cromosomico 2n + 1 (es. trisomie del cromosoma 13, 18, 21), e dalle **monosomie**, con assenza di un cromosoma, vale a dire un assetto cromosomico 2n – 1 (es. sindrome di Turner: 45, X0) (tab. 6.1).

Durante ciascuna delle due divisioni cellulari che caratterizzano la meiosi può verificarsi un errore nella segregazione (non-disgiunzione) di una coppia di cromosomi omologhi (nella prima divisione) o dei cromatidi fratelli di un cromosoma (nella seconda).

Ne consegue la formazione di gameti con un cromosoma in più (n + 1) o un cromosoma in meno (n – 1) (fig. 6.8).

Generalmente, il rischio aumenta con l'aumentare dell'età materna.

La non-disgiunzione può interessare tutte le coppie di cromosomi, così come evidenziato dagli studi di Citogenetica condotti sugli aborti spontanei.

Figura 6.7
Formazione di zigoti triploidi.

MONOSOMIE		POLISOMIE			
degli eterocromosomi		degli eterocromosomi		degli autosomi	
cariotipo	**sindrome**	**cariotipo**	**sindrome**	**cariotipo**	**sindrome**
45, X0	Turner	47, XXX 48, XXXX 49, XXXXX	Polisomie del cromosoma X, "superfemmine"	47, XX o XY, +21	Down Trisomia 21
		47, XXY 48, XXXY 49, XXXXY	Klinefelter	47, XX o XY, +18	Edwards Trisomia 18
		47, XYY 48, XXYY	Doppio Y	47, XX o XY, +13	Patau Trisomia 13
				47, XX o XY, +8	Trisomia 8

Tabella 6.1
Schema riassuntivo delle più comuni aneuploidie dei cromosomi sessuali e degli autosomi.

Considerazioni sulle aneuploidie

Si sa che una percentuale delle gravidanze (circa il 20%) si arresta spontaneamente prima del termine naturale. Lo studio degli aborti spontanei si è rivelato interessante dal punto di vista citogenetico, poiché in circa metà degli aborti vi è un'anomalia cromosomica. In essi si ritrovano tutte le anomalie dei cromosomi, anche se alcune, come le monosomie degli autosomi, hanno incidenza molto bassa, poiché comportano un'alterazione tanto grave da arrestare lo sviluppo dello zigote a stadi precocissimi.
Si verificano trisomie per tutti i cromosomi, anche se con frequenze diverse. Pertanto i nati vivi con trisomia rappresentano solo "la punta di un iceberg". Ad esempio, i trisomici 21 nati vivi sono solo il 20% dei concepiti con questa anomalia, poiché la maggior parte abortisce spontaneamente prima della 28esima settimana. Il cromosoma 21 non è più soggetto di altri a errori meiotici ma, poiché la sua presenza in triplice copia non sempre provoca l'arresto dello sviluppo embrionale, è quello percentualmente più rappresentato nei nati vivi trisomici.
Anche la monosomia dell'X presenta questo andamento: solo un quarto delle femmine con cariotipo 45, X0 concepite arriva alla nascita, mentre gli altri embrioni sono abortiti a stadi molto precoci. Relativamente ai cromosomi sessuali, con l'aumentare del numero di cromosomi soprannumerari aumenta la gravità della sintomatologia; questo dimostra che il dosaggio genico di questi cromosomi deve essere perfettamente equilibrato per il normale sviluppo sia nel maschio che nella femmina.

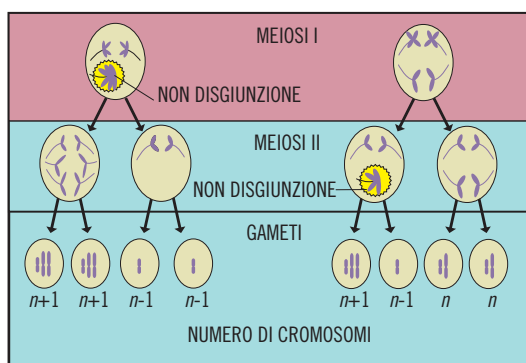



Figura 6.8
Non-disgiunzione in I divisione meiotica (a sinistra) e in II divisione meiotica (a destra) e conseguente formazione dei gameti.

Per saperne di più

MOSAICI

Un individuo viene definito **mosaico cromosomico** quando presenta almeno due linee cellulari diverse, derivate da uno stesso zigote, a seguito di un'anomalia in una delle cellule formatasi in un qualunque momento dello sviluppo embrionale; tutte le cellule che derivano da questa presenteranno la stessa anomalia. L'anomalia nei mosaici può essere sia strutturale che numerica. Nel caso in cui l'anomalia sia originata da una non-disgiunzione **mitotica** si originano due linee cellulari: una a 47 cromosomi e una a 45 (oltre alla linea normale a 46). La linea a 45 cromosomi è, però, letale, per cui l'individuo sarà costituito da due linee cellulari: una trisomica e una normale (fig. 6.9). In un mosaico, la gravità dello sbilanciamento dipende dal numero di cellule che compongono ciascuna linea cellulare, vale a dire dal momento in cui è avvenuto l'evento anomalo (la gravità dell'anomalia è maggiore quanto più precocemente si è verificato l'evento).

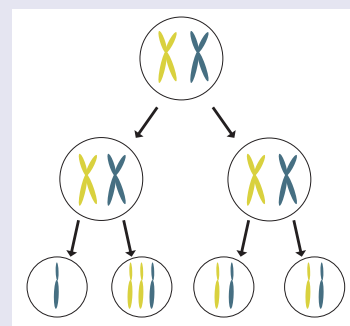



Figura 6.9
Origine di un mosaico cromosomico 46/47.

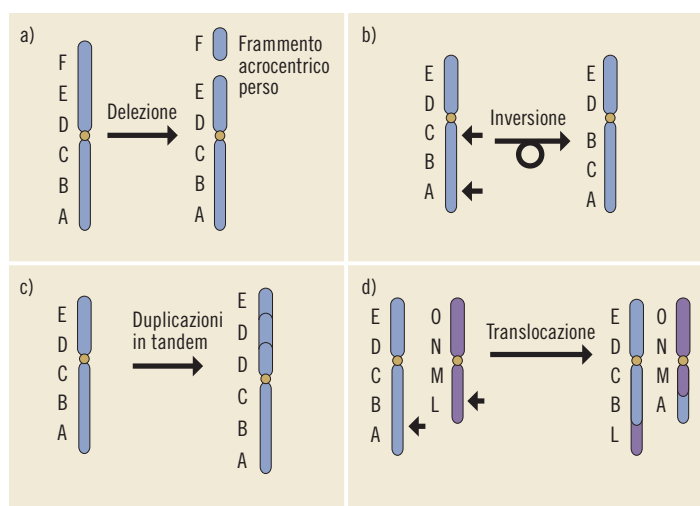



Figura 6.10
Alcune delle anomalie cromosomiche strutturali stabili più frequenti.

Anomalie di struttura

I cambiamenti di struttura possono coinvolgere uno, due o più cromosomi e sono il risultato di rotture ed eventuali ricongiungimenti errati di porzioni cromosomiche. In alcuni casi le rotture sono ricomposte in modo da ripristinare la struttura originaria, ma nella maggior parte dei casi sono alla base di un riarrangiamento cromosomico anomalo. Le modificazioni strutturali dei cromosomi possono essere sia **stabili**, vale a dire passano inalterate da una divisione cellulare all'altra, sia **instabili** in quanto non consentono una regolare divisione.

Le più importanti **modificazioni stabili** sono (fig. 6.10):

- **delezione**: perdita di un frammento di cromosoma. La delezione può essere terminale, causata da una singola rottura cromosomica all'estremità (fig. 6.10a) o, più frequentemente, interstiziale, come conseguenza di due rotture all'interno del cromosoma;
- **inversione**: rottura del cromosoma in due punti con formazione di un segmento cromosomico che si reinserisce dopo rotazione di 180° (fig. 6.10b);
- **duplicazione**: raddoppiamento di un tratto di un cromosoma (fig. 6.10c). Le duplicazioni sono più frequenti e meno dannose delle delezioni;
- **traslocazione**: spostamento di un tratto o di un intero cromosoma su di un altro cromosoma non omologo (fig. 6.10d); quando, in seguito al riarrangiamento, la quantità totale del materiale genetico non risulta alterata, si parla di **traslocazione bilanciata** e non si hanno effetti sul fenotipo. Le traslocazioni possono però causare la produzione di gameti con corredo genico sbilanciato e quindi essere responsabili di gravi sindromi nella prole.

Per saperne di più

L'IBRIDAZIONE *IN SITU* SUI CROMOSOMI

Una nuova tecnica di Genetica molecolare, la **FISH** (*Fluorescence In Situ Hybridization*), consente di individuare anomalie submicroscopiche di struttura dei cromosomi anche molto piccole, non rilevabili quindi con la citogenetica convenzionale. Tale metodica, applicata ai cromosomi metafasici, ha incrementato il livello di risoluzione della citogenetica convenzionale (che arriva a identificare le anomalie cromosomiche superiori a 4 Mb) permettendo di visualizzare anomalie che coinvolgono poche migliaia di paia di basi.
La FISH è una tecnica di ibridazione molecolare *in situ*, inizialmente sviluppata per la mappatura (localizzazione) dei geni sui cromosomi, che permette di visualizzare a livello cromosomico la localizzazione di un gene o di una qualsiasi sequenza genomica d'interesse e le loro anomalie (traslocazioni, delezioni o duplicazioni) usando sonde di DNA marcate con composti fluorescenti (fig. 6.11). In breve, il DNA dei cromosomi metafasici viene denaturato a 100°C e fatto rinaturare abbassando la temperatura a 65°C in presenza di un eccesso di una sonda nucleotidica a singolo filamento complementare alla sequenza di interesse. La reazione di ibridazione viene fatta avvenire su un vetrino sul quale è stato allestito un preparato cromosomico e quindi permette di visualizzare l'acido nucleico d'interesse *in situ*, cioè nella sua sede naturale: il cromosoma.

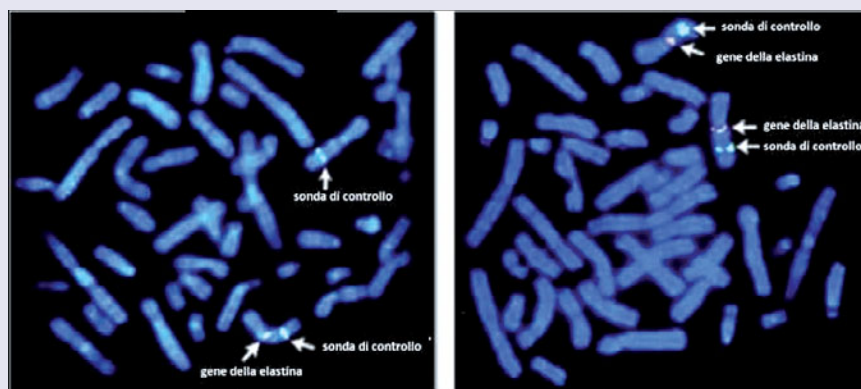



Figura 6.11
La sindrome di Williams è una malattia genetica rara che causa anomalie della crescita, dello sviluppo cognitivo e difetti del cuore. I soggetti con questa sindrome sono portatori di una delezione nel braccio lungo del cromosoma 7 (46, -7q) che include il gene dell'elastina. Nella figura, a sinistra una FISH in un soggetto con sindrome di Williams che mostra la perdita di una copia del gene dell'elastina su uno dei cromosomi 7; a destra una FISH su un soggetto normale, in cui il gene dell'elastina è presente in duplice copia. Sono state utilizzate due sonde fluorescenti diverse, una per il gene dell'elastina e una per un gene di controllo localizzato sullo stesso cromosoma.

Analisi del cariotipo umano in laboratorio

Colture cellulari e terreni di coltura

Per poter effettuare un'analisi cromosomica è necessario utilizzare cellule in mitosi, che possono essere ottenute da campioni prelevati espressamente per questa analisi (sangue periferico, liquido amniotico, villi coriali) o da colture cellulari.
I tessuti che più si prestano a essere coltivati *in vitro* sono quelli che già *in vivo* mostrano attività proliferativa. Essi comprendono tessuti embrionali, adulti e tumorali. In linea teorica è possibile allestire preparati cromosomici a partire da qualsiasi tessuto, purché si usino i metodi adatti per ciascun tipo di cellule da esaminare. Nell'uomo, la maggior parte delle procedure diagnostiche citogenetiche utilizza colture di linfociti, cellule del midollo osseo, cellule embrionali sospese nel liquido amniotico, villi coriali e fibroblasti cutanei.
I primi terreni di coltura studiati per le colture *in vitro* di tessuti animali, e ancora oggi utilizzati per particolari tipi di colture, erano costituiti esclusivamente da componenti naturali, come il plasma o il siero, il liquido amniotico, gli estratti di tessuti e di organi.
Nell'intento di rendere più controllabili, e quindi riproducibili, le condizioni di coltura *in vitro*, i terreni nutritivi naturali sono stati progressivamente sostituiti con soluzioni a composizione chimica nota.
Esistono terreni di coltura con formulazioni adatte a coprire le necessità dei diversi tipi di colture cellulari. Il terreno di coltura deve fornire i nutrienti essenziali per le cellule, ossia aminoacidi, carboidrati, acidi grassi, vitamine e cofattori. Esso, inoltre, mantiene costanti le condizioni dell'ambiente chimico di crescita cellulare, come pH ed osmolarità, grazie alla presenza di ioni di sali inorganici. La stabilità del pH del terreno è ottenuta grazie alla presenza di un sistema tampone.
Per quanto esistano in commercio terreni di coltura definiti in tutti i loro componenti, nella maggior parte delle colture non può essere evitata l'aggiunta di siero animale, costituito da numerose componenti proteiche e non, per la maggior parte sconosciute.

Coltura di linfociti per ottenere cromosomi metafasici

Per le analisi cromosomiche le colture cellulari sono in genere ottenute da linfociti, cellule del sangue della serie bianca, utilizzate a questo scopo data la facilità con cui questo tessuto è prelevabile

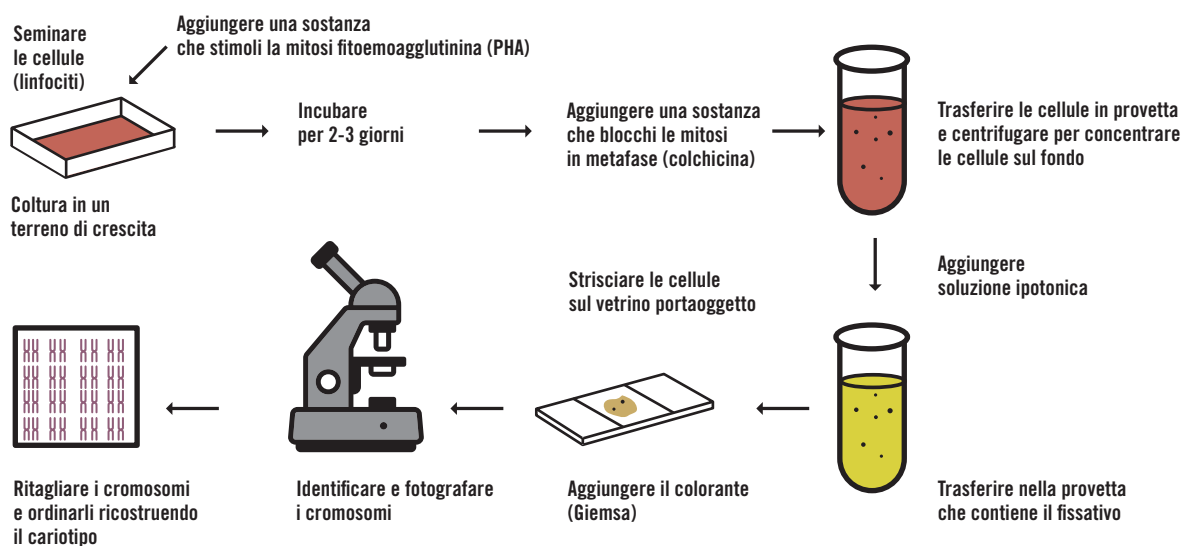



Figura 6.12
Procedura di allestimento di un preparato cromosomico.

dall'organismo. I globuli rossi non si prestano per l'analisi cromosomica, essendo privi di nucleo.
Le cellule vengono messe in coltura in una provetta a 37 °C in presenza di fitoemoagglutinina (PHA, dall'inglese *phytohaemoagglutinin*, una sostanza che induce i linfociti a entrare in mitosi); raggiunta una fase di crescita esponenziale, viene aggiunta per un'ora la colchicina, una sostanza che inibisce la formazione del fuso mitotico bloccando le mitosi in metafase.
Le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione (e scarto del surnatante) e trattate con una soluzione ipotonica per determinarne il rigonfiamento e la rottura della membrana cellulare. Segue un trattamento con fissativo che stabilizza la struttura dei cromosomi, altrimenti fragili, e rende più duraturo il preparato, ritardando l'azione degli agenti ossidanti.
Il sedimento cromosomico è mantenuto in una soluzione di fissativo (costituita da metanolo e acido acetico in rapporto 3:1). Il citoplasma, in cui sono immersi i cromosomi, risulta disidratato dall'alcool e ridotto dall'acido acetico; i cromosomi mantengono la medesima posizione che presentavano prima della fissazione nel citoplasma. Il passaggio in fissativo viene ripetuto almeno una seconda volta, dopo di che la sospensione cromosomica può essere conservata in provetta alla temperatura di −20°C anche per qualche anno, prima di venire strisciata su vetrino (fig. 6.12).
Per ottenere vetrini con cromosomi metafasici fissati da osservare al microscopio, scaricate le schede del protocollo di laboratorio sulle analisi cromosomiche. Potete anche esercitarvi a riconoscere assetti cromosomici umani normali e patologici, scaricando una serie di immagini di cariotipi con bandeggio Q.

7. Anche i geni possono diventare reporter

Attraverso questa attività imparerai come i geni possono fare i "reporter" ed essere utilizzati in diversi ambiti della Biologia.

L'esperimento propone uno scenario in cui l'utilizzo di un gene reporter, inserito in piante di Arabidopsis thaliana*, consente di verificare la presenza di inquinanti (come il cadmio) nel terreno.*

I geni reporter

Il termine "reporter" proviene dall'inglese e significa "colui che riporta, fa una relazione". I geni reporter sono geni utilizzati dai ricercatori per "riportare" informazioni relative all'espressione di un altro gene di interesse e/o all'attività del suo promotore. Una caratteristica importante di un gene reporter è quella di produrre una proteina rilevabile e quantificabile con un saggio semplice, rapido, sensibile e riproducibile, ad esempio una proteina che determina la colorazione del tessuto in cui si esprime, o emissione di fluorescenza, oppure un'attività enzimatica facilmente misurabile. Supponiamo di voler studiare quando si esprime un certo gene X: si dovrà costruire un vettore in cui un gene reporter (ad esempio il gene GFP, *Green Fluorescent Protein*, che codifica una proteina che emette fluorescenza verde, vedi più avanti) è inserito a valle del promotore del gene X in modo da mantenere la corretta cornice di lettura (fig. 7.1). Nelle cellule in cui è stato inserito stabilmente il vettore, quando il promotore del gene

Conoscenze propedeutiche

- La struttura di DNA e RNA
- La struttura di un gene
- La duplicazione del DNA
- La sintesi proteica
- I vettori plasmidici
- La retro-trascrizione e il cDNA

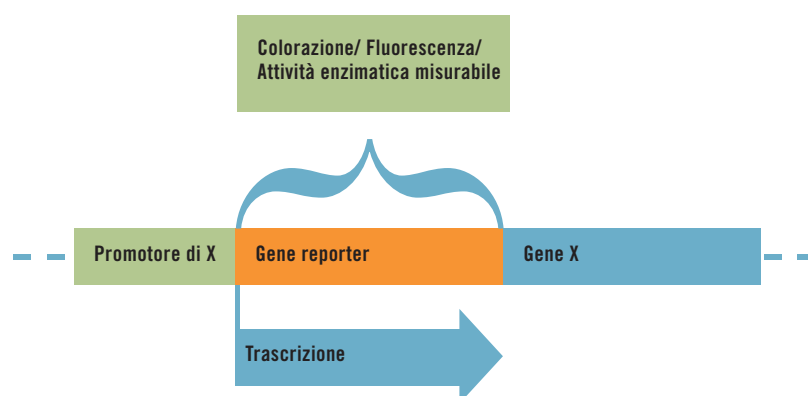



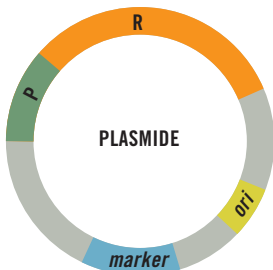
Figura 7.1
Il gene reporter è inserito a valle del promotore del gene d'interesse (gene X) e ne segnala l'espressione.

ori= origine di replicazione
P= promotore di X
R= gene reporter
marker= gene che conferisce resistenza a un antibiotico

Figura 7.2
Esempio di un plasmide per l'inserimento di un gene reporter in una cellula.

Figura 7.3
La medusa *Aequorea victoria*.

Tabella 7.1

GENE REPORTER	PRODOTTO	ATTIVITÀ
GFP	Green Fluorescent Protein	Proteina in grado di emettere fluorescenza verde quando eccitata da radiazione a specifica lunghezza d'onda.
Luc	luciferasi della lucciola (*Photinus pyralis*)	Enzima che agisce sul suo substrato (luciferina), in presenza di ATP, ossigeno e Mg^{++}, determinando l'emissione di luce verde/gialla.
GUS	ß-glucuronidasi batterica	Enzima che agisce su alcuni composti, ß-glucuronidi, dando una colorazione blu.
ß-gal	ß-galattosidasi	Enzima che agisce su alcuni composti, come X-gal, dando una colorazione blu.
Lux A e Lux B	luciferasi batterica	Enzima che agisce sul suo substrato (luciferina), in presenza di aldeide alifatica a catena lunga e ossigeno, determinando l'emissione di luce blu/verde.
Ruc	luciferasi da *Renilla reniformis*	Enzima che agisce sul suo substrato (una luciferina detta Celenterazina), in presenza di ioni Ca^{++} e ossigeno, determinando l'emissione di luce blu.

X è attivo, è prodotto un mRNA unico da cui viene sintetizzata una proteina di fusione (proteina X + GFP). La localizzazione della proteina di interesse può essere rilevata osservando le cellule in coltura con un microscopio a fluorescenza.
La proteina codificata dal gene reporter deve essere assente nella specie in esame e la sua attività enzimatica deve essere facilmente distinguibile da ogni altra attività enzimatica simile presente nella cellula; inoltre la sua attività non deve presentare competizione né interferenza con altre attività enzimatiche cellulari.
Un'ulteriore e molto diffusa applicazione dei geni reporter è quella dello studio del promotore di un dato gene in un determinato tipo di cellula o durante lo sviluppo di un organismo. In questo caso, bisogna costruire un vettore in cui la sequenza del promotore, o parti di essa, vengono poste a monte del gene reporter (in questo caso nel vettore il gene "di interesse" non c'è). L'attività del promotore è analizzata misurando il prodotto del gene reporter direttamente nelle cellule trasformate.

Come si inserisce un gene reporter in una cellula?

Per introdurre un gene reporter in una cellula, viene costruito un vettore (in genere un plasmide) in cui il gene reporter è posizionato a valle del promotore del gene che si vuole studiare (seguito o meno dal gene "di interesse").
Il vettore deve contenere, oltre all'origine di replicazione, un gene marcatore selezionabile (*marker*), ad esempio un gene che conferisce resistenza a un antibiotico che consente di selezionare le cellule in cui è avvenuto l'inserimento del gene reporter (fig. 7.2).

Nella tabella 7.1, sono riportati alcuni esempi di geni reporter, la proteina da loro prodotta e la sua attività: il prodotto può essere un enzima che, in presenza di un substrato specifico, fornisce un "segnale" visibile; oppure una proteina che emette fluorescenza quando eccitata da luce di una determinata lunghezza d'onda.

Descrizione dell'attività dei prodotti dei geni reporter più utilizzati

Tra i prodotti dei geni reporter indicati in tabella 7.1 descriviamo brevemente quelli più largamente utilizzati.

GFP *(Green Fluorescent Protein)*

La GFP è in grado di emettere luce di colore verde acceso se colpita da radiazione a specifica lunghezza d'onda; la sua scoperta, la sua modifica e il suo utilizzo hanno valso il premio Nobel per la chimica nel 2008 a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Y. Tsien.
La GFP è stata scoperta nel 1962 in una medusa, la *Aequorea victoria* (fig. 7.3), che vive in Nord America lungo le coste del Pacifico, alla quale conferisce la caratteristica bioluminescenza di colore verde. Nella proteina è presente una porzione di 3 aminoacidi, detta fluoroforo, ben protetta all'interno di una struttura a "barile" (fig. 7.4): quando la radiazione blu (475 nm) o ultravioletta (395 nm) colpisce il fluoroforo, alcuni suoi elettroni assorbono energia per passare a un livello energetico superiore (stato eccitato), per poi ricadere nello stato fondamentale, emettendo radiazione a energia inferiore di colore verde (505 nm). La scoperta di questa proteina che si accende "automaticamente", in presenza di ossi-

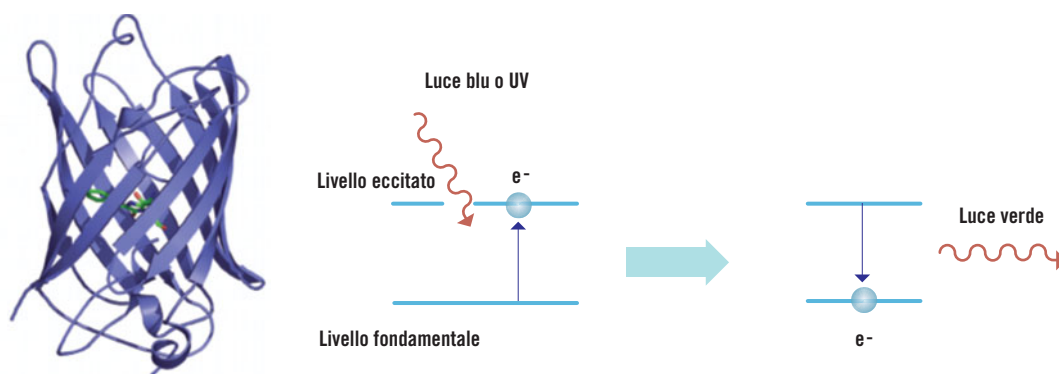



Figura 7.4
La struttura della GFP e il meccanismo di eccitazione degli elettroni (e^-).

geno e senza necessità di attivazione da parte di enzimi o altri fattori, ha rivoluzionato le tecniche di studio della Biologia cellulare, consentendo nuovi approcci per l'analisi dell'espressione genica, la localizzazione dinamica di proteine, la divisione cellulare e molti altri processi in cellule vive.

Luciferasi

La luciferasi della lucciola è un enzima in grado di catalizzare la produzione di luce a partire dall'ossidazione della proteina luciferina in presenza di ATP, ossigeno e ioni Mg^{++} (fig. 7.5).
Il metodo che utilizza il gene della luciferasi ha i vantaggi di essere molto sensibile, di non avere nessuna interferenza (perché la maggior parte delle cellule non ha attività di luciferasi), di utilizzare un saggio rapido e a bassi costi. Il gene migliore è quello della lucciola nordamericana *Photinus pyralis*, la cui proteina non è tossica, non richiede modificazioni post-traduzionali e, quindi, funziona sia in cellule procariotiche che eucariotiche: la luminescenza prodotta è gialla (560 nm).
In generale, il vettore contenente il gene reporter viene inserito nelle cellule. Dopo un certo tempo le cellule sono lisate, attraverso l'aggiunta di un opportuno tampone di lisi, così da ottenere un estratto cellulare in cui si introducono: luciferina (il substrato della luciferasi), Mg^{++} e un eccesso di ATP. L'enzima luciferasi, eventualmente espresso, catalizza l'ossidazione della luciferina causando luminescenza gialla. Questo effetto può essere quantificato con un luminometro, uno strumento che misura l'intensità luminosa: la quantità di luce emessa è correlabile direttamente con l'attività del promotore.
Un'altra luciferasi è quella di *Renilla reniformis*, un celenterato: questo enzima, in presenza di

Figura 7.5
A sinistra, schema della reazione catalizzata dalla luciferasi della lucciola e, a destra, *Photinus pyralis.*

Figura 7.6
Schema della reazione catalizzata dalla luciferasi di *R. reniformis* e, a destra, la medusa.

ioni Ca^{++} e ATP, eccita un'altra luciferina, la celenterazina, che produce luce blu (fig. 7.6).
Le attività della luciferasi della lucciola e di quella di *Renilla* possono essere combinate in un unico saggio che utilizza entrambi i geni reporter.
Il limite di questo saggio sta nel fatto che viene effettuato su estratti cellulari (non su cellule) e richiede l'aggiunta di un substrato. Non è adatto per seguire processi dinamici e variabili nel tempo in cellule vive.

β-galattosidasi

La β-galattosidasi è un enzima di *Escherichia coli* in grado di scindere il disaccaride lattosio nei due componenti (galattosio + glucosio); l'enzima è in grado di scindere un substrato chiamato X-gal (composto da galattosio e da una molecola precursore dell'indaco, il 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo) e le cellule che lo esprimono si colorano di blu.

β-glucuronidasi (GUS)

La β-glucuronidasi è un enzima di *Escherichia coli* utilizzato nel saggio GUS, la tecnica ideata da R.A. Jefferson, che è in assoluto la più diffusa nello studio della Biologia vegetale. L'enzima β-glucuronidasi è in grado di scindere derivati dell'acido glucuronico; se l'enzima agisce su specifici substrati incolori e non fluorescenti è in grado di renderli colorati o fluorescenti, dunque visibili all'operatore. Come substrati di reazione si possono usare diverse sostanze. Per la colorazione istochimica viene utilizzato prevalentemente il 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronide (X-Gluc), che per idrolisi forma un precipitato indaco insolubile (fig. 7.8). Per i saggi quantitativi (saggi spettrofotometrici) si usa il p-nitrofenil β-D-glucuronide, da cui deriva una sostanza colorata e solubile; per i saggi fluorimetrici si utilizza il 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide, da cui viene prodotta una sostanza fluorescente e solubile.
Un organismo è adatto per il saggio GUS se non ha una propria attività β-glucuronidasica (o se

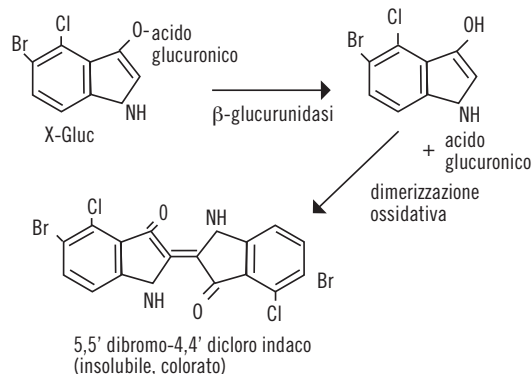
Per saperne di più

NON SOLO VERDE

L'idea di utilizzare la GFP come gene reporter di espressione per studiare la localizzazione e le funzioni di specifiche proteine nelle cellule viventi risale alla fine degli anni ottanta del secolo scorso. Nel 1994 sono stati trasformati batteri di *Escherichia coli* facendogli esprimere la GFP; in seguito il gene GFP è stato inserito con successo in sei specifici neuroni di *Caenorhabditis elegans* (un nematode). Tuttavia la GFP naturale ha dei limiti: è scarsamente foto-stabile, presenta un doppio picco di eccitazione (luce blu a 475nm e UV a 395nm) e ha difficoltà nell'assumere una corretta conformazione a 37 °C. Per ovviare a questi limiti, la proteina è stata modificata in laboratorio ottenendo una GFP con maggiore foto-stabilità e con una fluorescenza più brillante; sono state prodotte anche proteine con spettri di eccitazione ed emissione diversi, di colore giallo (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*), azzurro-grigio (CFP, *Cyan Fluorescent Protein*), blu (BFP, *Blue Fluorescent Protein*) (fig. 7.7). Il grande vantaggio di queste proteine sta nella mancanza di tossicità e nella estrema facilità di rilevamento: il loro impiego simultaneo consente lo studio a livello molecolare di diversi processi biologici contemporaneamente (e anche di processi dinamici) in una singola cellula in coltura e, in organismi semplici, anche in vivo.

Figura 7.7
Da sinistra a destra: BFP, CFP, GFP e YFP.

Figura 7.8
Schema della reazione catalizzata dalla ß-glucurunidasi su X-Gluc.

X-Gluc — β-glucurunidasi → + acido glucuronico — dimerizzazione ossidativa → 5,5' dibromo-4,4' dicloro indaco (insolubile, colorato)

questa attività è sufficientemente bassa, per cui il "rumore di fondo" è accettabile). Per questa ragione il saggio non può essere utilizzato nella maggior parte dei vertebrati e in molti molluschi. Nelle piante superiori, nei muschi, nelle alghe, nei funghi e in quasi tutti i batteri non c'è attività GUS endogena, per cui la tecnica può essere usata proficuamente.

I geni reporter per l'ambiente

Il monitoraggio ambientale prevede spesso l'utilizzo di organismi viventi come indicatori della qualità ambientale: tali organismi sono detti **bioindicatori** (o indicatori biologici) e forniscono informazioni sulla qualità ambientale e sui livelli di inquinamento, perché rispondono a determinate condizioni con variazioni che possono essere identificate e talvolta quantificate. Queste variazioni spesso riguardano il tasso di mortalità, di crescita o di riproduzione della specie bioindicatrice: ad esempio, la qualità delle acque dolci può essere monitorata studiando la composizione di comunità di invertebrati, così come la diminuzione della fertilità e del numero di specie di licheni è indice di inquinamento atmosferico. Altre variazioni sono di tipo morfologico e funzionale: ad esempio, sempre nei licheni, l'inquinamento atmosferico ne causa lo scolorimento e la riduzione del "corpo" (fig. 7.9).

Oltre a utilizzare organismi naturali per lo studio della qualità ambientale, sono stati messi a punto **bioindicatori transgenici**, ossia organismi in cui sono stati inseriti geni reporter sotto il controllo di un promotore sensibile alle variazioni del parametro ambientale che si vuole studiare, come la presenza di un particolare contaminante. Ad esempio, per l'individuazione di arsenico nell'acqua dei pozzi, si utilizzano batteri resistenti all'arsenico e modificati geneticamente in modo da esprimere la GFP in presenza dell'elemento tossico.

In particolare, l'utilizzo di **piante transgeniche** come bioindicatori presenta alcuni vantaggi, legati principalmente alla loro natura di organismi complessi, sedentari, naturalmente adatti alla crescita sul suolo, la cui coltura è relativamente facile e poco costosa. Inoltre, le piante rappresentano il principale punto di ingresso nella catena alimentare umana e animale per numerosi inquinanti e/o composti tossici.

Per costruire bioindicatori vegetali si utilizzano dei vettori contenenti geni reporter. A differenza di quanto visto precedentemente, in questo caso il gene reporter viene posto sotto il controllo di un promotore di cui sia già nota la sensibilità alle modificazioni di un dato parametro ambientale. Un particolare esempio di bioindicatore vegetale è rappresentato da piante di *Arabidopsis thaliana* transgeniche in grado di evidenziare la presenza di mine di terra: in esse è stato inserito un gene per la sintesi degli antociani (una classe di composti che conferisce colorazioni rosa-blu-violet-

Per saperne di più

LA PIANTA CHE UTILIZZIAMO: *ARABIDOPSIS THALIANA*

Arabidopsis thaliana (o *Thale Cress*, oppure arabide comune) è una pianta annuale che cresce nei sentieri o sui muri dei giardini e fa parte della stessa famiglia del cavolo e della senape. Cresce in diversi habitat, dal Polo Artico all'Equatore, con notevoli capacità di adattamento. Si tratta di una specie cosmopolita in grado di sopravvivere in una vasta gamma di ambienti e di adattarsi alle diverse condizioni esterne, presentando numerose varietà locali. *Arabidopsis thaliana* è diventata negli ultimi anni un organismo modello per lo studio della Genetica e della Biologia molecolare e cellulare delle piante poiché possiede una serie di vantaggi: piccole dimensioni (che la rendono ideale negli spazi ristretti dei laboratori e delle serre negli istituti di ricerca), ciclo vitale breve (circa sei settimane), elevata produttività di semi (fino a 10 000 semi per pianta), ridotte dimensioni del suo genoma (circa 125 milioni di paia di nucleotidi, in soli cinque cromosomi). *Arabidopsis* è la prima pianta da fiore di cui sia stato sequenziato il genoma, grazie a una ricerca avviata nel 1991 dalla Commissione europea e basata sulla collaborazione di laboratori di 15 paesi, tra cui Stati Uniti e Giappone (Nature 408, 791, 14 December 2000).

Un ulteriore vantaggio di *Arabidopsis* è la semplicità con la quale si possono produrre piante transgeniche, tramite il processo di trasformazione genetica, sfruttando il batterio *Agrobacterium tumefaciens* per incorporare nuovo DNA nel genoma della pianta (vedi Esercitazione n°2).

Figura 7.9
Licheni danneggiati: l'inquinamento ne ha causato lo scolorimento e il distacco del "corpo" dal substrato.

Figura 7.10
La colorazione blu, dovuta agli antociani delle piante transgeniche di *Arabidopsis*, indica presenza di tritolo.

to) la cui espressione è controllata da un promotore sensibile al tritolo (fig. 7.10).
In modo analogo sono state sviluppate piante di *Arabidopsis* transgeniche per il monitoraggio della concentrazione di specifici metalli nel suolo. Tali bioindicatori sono stati costruiti integrando stabilmente nel genoma della pianta un vettore in cui l'espressione del gene reporter GUS (rilevabile grazie a una colorazione blu dei tessuti vegetali in presenza del substrato opportuno) è posta sotto il controllo del promotore di un gene specificamente indotto dalla presenza di metallo nel mezzo di crescita. Queste piante, non solo sono in grado di indicare la presenza del metallo nel mezzo di crescita, ma forniscono un segnale la cui intensità è dipendente dal livello di contaminazione. I risultati ottenuti a livello sperimentale con questo approccio sono incoraggianti, ma sono necessarie ulteriori prove, in condizioni più simili a quelle di campo, per valutare la reale applicabilità di queste piante come bioindicatori.
Il nostro esperimento si basa sull'utilizzo di piante di *Arabidopsis* sensibili alla presenza di cadmio nel terreno.

Per saperne di più

I METALLI PESANTI NELL'AMBIENTE: IL CASO DEL CADMIO

Il **cadmio** (Cd) (fig. 7.11) è un metallo pesante, ossia un metallo la cui densità supera i 5 g/cm^3; in particolare, è un metallo pesante non essenziale, in quanto non è richiesto per la crescita delle piante e, in molti casi, può esercitare effetti tossici. La sua rilevanza come contaminante ambientale e la sua mobilità nel sistema suolo-pianta hanno reso questo metallo tossico il più studiato nelle piante. Inoltre il cadmio ha un notevole impatto rispetto sia all'esposizione delle piante sia all'accumulo nella catena alimentare umana: è, infatti, un elemento biopersistente, poiché, una volta assorbito da un organismo, rimane in esso per molti anni (dell'ordine di decine per gli uomini) prima di venire espulso.
Il cadmio è assorbito dalle piante attraverso gli stessi sistemi di trasporto utilizzati dai cationi essenziali come Zn^{++}, Ca^{++} e Fe^{++}. Le proprietà tossicologiche del cadmio derivano dalla sua somiglianza chimica con lo zinco, un micronutriente essenziale per piante, animali ed esseri umani.
Negli organismi vegetali l'esposizione a elevate concentrazioni di Cd^{++} comporta l'inibizione della crescita sia delle radici che della parte aerea della pianta, la comparsa di clorosi fogliare, l'alterazione del bilancio idrico, l'inibizione dell'apertura stomatica e una diminuzione della sintesi della clorofilla. La tossicità del cadmio potrebbe essere legata a interferenze con numerosi processi, come il metabolismo dei carboidrati e la fotosintesi, probabilmente perché porta a un'inattivazione enzimatica. Inoltre, l'accumulo di cadmio produce specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido e il perossido d'idrogeno, che danneggiano acidi nucleici e proteine.
Alcune piante evidenziano capacità di tolleranza, sopportando una elevata concentrazione del metallo senza evidenziare effetti sul loro metabolismo.
L'assorbimento di cadmio da parte degli esseri umani avviene principalmente attraverso il cibo. Derrate alimentari ricche in cadmio possono notevolmente aumentare la sua concentrazione nel corpo umano. Alcuni degli alimenti in cui si possono accumulare elevate concentrazioni di cadmio sono fegato, funghi, crostacei, mitili, polvere di cacao e alghe secche. Il cadmio ingerito è trasportato al fegato principalmente tramite il sangue. Nel fegato si lega a proteine formando complessi che arrivano poi ai reni, dove il cadmio si accumula, danneggiando i meccanismi di filtrazione. Ciò causa l'escrezione di proteine essenziali e di zuccheri con ulteriore danno renale. Occorre molto tempo prima che il cadmio accumulato nei reni sia espulso dal corpo umano.

Figura 7.11
Un'insolita "carta d'identità" del cadmio.

Il nostro esperimento

Scenario

Un campo deve essere seminato con erbe officinali, ma le analisi di una falda acquifera vicina rivelano la presenza di cadmio. Si vuole verificare se anche il terreno da coltivare è contaminato dal cadmio: a tal fine si è deciso di utilizzare piante di *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificate in grado di rivelare la presenza di cadmio nel suolo. Il vostro laboratorio sta quindi predisponendo i semi per le piantine transgeniche: sono necessari dei saggi sperimentali per verificare che essi siano idonei all'uso, prima di procedere al loro utilizzo in campo.

Il costrutto genetico utilizzato per trasformare *Arabidopsis*

Gli esperimenti utilizzeranno piante di *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificate che esprimono il gene reporter GUS di *Escherichia coli* (GUS = β-glucuronidasi, enzima poco espresso nelle piante). L'enzima β-glucuronidasi è in grado di scindere X-Gluc liberando una molecola di acido glucuronico e una molecola di 5-bromo-4-cloro indaco che, in seguito a una reazione di dimerizzazione ossidativa, forma un precipitato insolubile e colorato, il 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indaco (figg. 7.8 e 7.13).

Nel costrutto genetico l'espressione del gene GUS è regolata dal promotore di un gene coinvolto nelle risposte delle piante alla presenza di cadmio (fig. 7.12): *Arabidopsis* diventa quindi un bioindicatore in grado di mettere in evidenza la presenza del metallo nel suolo.

Allevamento delle piante

Le piante di *Arabidopsis* utilizzate sono ottenute in laboratorio previa sterilizzazione dei semi: questi sono quindi seminati in condizioni di sterilità, su terreni di crescita contenenti agar, con e senza cadmio (sotto forma di cloruro di cadmio, $CdCl_2$).
I semi sono lasciati crescere per 10 giorni in una camera di crescita mantenuta a 23 °C, con un fotoperiodo di 16 ore.
Su queste piante è possibile svolgere l'esperienza descritta dai protocolli scaricabili.

Analisi dei risultati

Il saggio istochimico effettuato su piante transgeniche che esprimono il gene GUS rivela la colorazione indaco solo nelle piante cresciute in terreni contenenti cadmio (fig. 7.14).
Nella figura si osserva la colorazione nell'apparato radicale, nell'apice di crescita e nelle nervature delle foglie.

Analisi dell'espressione del gene reporter attraverso RT-PCR

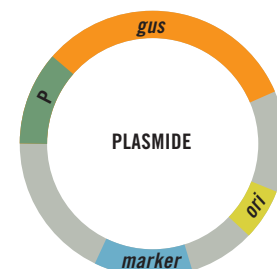
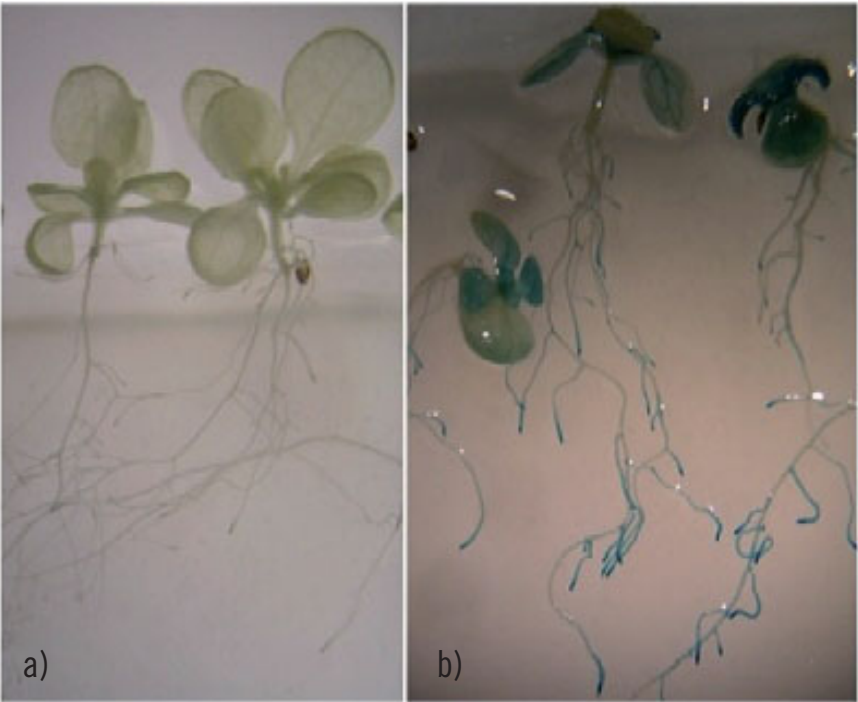
Partendo dal RNA estratto dalle foglie di *Arabidopsis* di fenotipo selvatico e di piante transgeniche, cresciute in terreni completi con e senza cadmio, mediante retro-trascrizione e amplificazione (PCR) con opportuni *primer*, si ottengono copie parziali di cDNA codificanti per il gene

ori = origine di replicazione
P = promotore di X
gus = gene reporter
marker = gene che conferisce resistenza a un antibiotico

Figura 7.12
Il plasmide utilizzato per l'inserimento del gene reporter GUS in *Arabidopsis*.

Figura 7.13
Effetto fenotipico della reazione catalizzata dalla ß-glucuronidasi su X-gluc in piantine di *Arabidopsis* transgeniche.

Figura 7.14
Espressione del gene GUS in piante di *Arabidopsis* transgeniche cresciute in presenza di cadmio (b): il gene non si esprime in piante cresciute in terreno di controllo (a).

GUS e per il gene di controllo 16S, per che codifica per RNA della subunità minore dei ribosomi di plastidi e mitocondri.
I campioni ottenuti sono analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.
Se retro-trascrizione e PCR hanno funzionato bene, è logico aspettarsi in tutte le corsie caricate la presenza della banda relativa al gene di controllo S16, come riportato nello schema (fig. 7.15).
In quali dei campioni caricati sarà presente anche la banda relativa al gene GUS?

La foto del gel (fig. 7.16) evidenzia il profilo di espressione del gene GUS e del gene di riferimento: il gene GUS è espresso solo in piante trasformate e in presenza di cadmio nel terreno.

Figura 7.15
Schema dell'espressione del gene di controllo S16 in piante cresciute in terreni completi in assenza (C) e in presenza (+Cd) di cadmio.

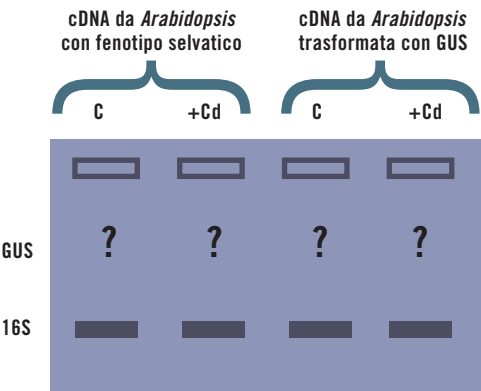
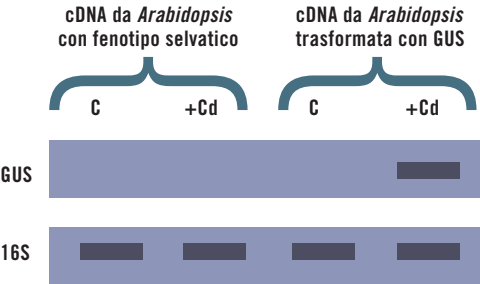



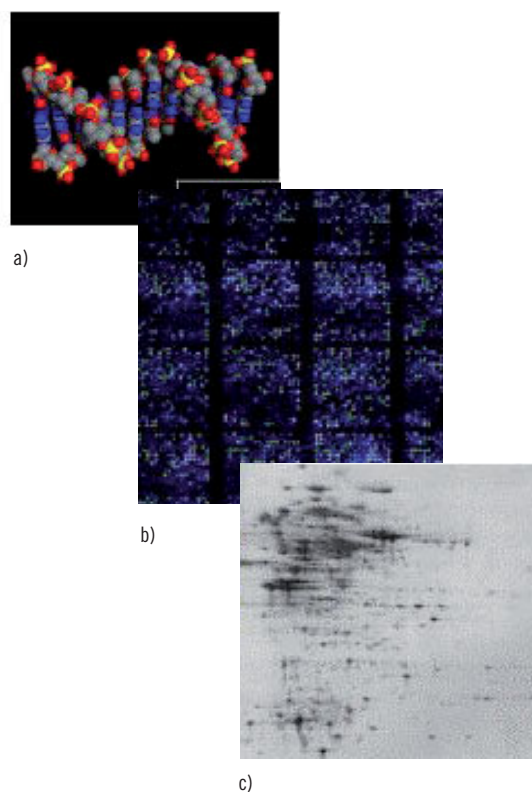
Figura 7.16
Schema dei risultati ottenuti. Nella pianta con fenotipo selvatico non c'è espressione del gene GUS; nella pianta trasformata, il gene GUS si esprime solo in presenza di cadmio nel terreno. Il gene di controllo 16S è espresso in misura paragonabile in tutte le condizioni esaminate.

8. Separazione e colorazione di proteine

Lo scopo dell'esperimento è analizzare il contenuto di proteine in un tessuto o in una popolazione selezionata di cellule.

Esistono diverse procedure, ma quella che utilizzeremo in questa attività è basata sulla separazione di proteine mediante elettroforesi su gel di acrilammide, sulla loro colorazione e sul ricoscimento di una specifica proteina avendo a disposizione degli anticorpi prodotti contro la proteina in esame.

Dal DNA alle proteine

Il genoma (DNA) di un organismo multicellulare (ad es. l'uomo) è sempre lo stesso in tutte le sue cellule, mentre il proteoma (il numero e il tipo di proteine) varia nelle cellule dello stesso individuo. Il proteoma, inoltre, cambia nel tempo rispondendo a una molteplicità di fattori di natura metabolica, fisiologica, farmacologica, nutrizionale, ambientale e, nell'uomo, anche in funzione dello stato di salute o malattia.

Il proteoma è più plastico e dinamico del genoma. Va però sottolineato, per evitare equivoci, che anche il genoma non va considerato come un'entità statica. Infatti, ciò che rimane pressoché stabile è la sequenza dei nucleotidi nel DNA, mentre la struttura tridimensionale del DNA varia nei diversi tessuti e nel tempo in relazione alla loro espressione. È proprio in virtù della variazione dell'espressione genica che si determina gran parte della plasticità del proteoma (fig. 8.1). I geni funzionalmente più importanti sono quelli che vengono "trascritti" in RNA messaggeri (mRNA) e poi "tradotti" in proteine secondo le regole del "codice genetico". Assumendo che nel genoma umano possano esserci più

Conoscenze propedeutiche

- Il DNA
- Il codice genetico
- La sintesi proteica
- La struttura e le caratteristiche delle proteine (polipeptidi)
- La funzione delle proteine

Figura 8.1
a) Il genoma contiene l'informazione genetica della specie; b) Il trascrittoma, analizzabile con la tecnica dei *microarrays*, rappresenta l'insieme dei mRNA espressi in un dato tipo cellulare in un determinato momento; c) il proteoma, definibile attraverso l'elettroforesi bidimensionale, è l'insieme di proteine trovate in un particolare tipo di cellule in determinate condizioni.

o meno 20 000-23 000 geni trascrivibili in mRNA, si ritiene che il proteoma dell'uomo possa essere circa 100-1000 volte più ampio, raggiungendo la complessità di 2.3×10^{6}-10^{7} proteine. Tale diversità si raggiunge attraverso due meccanismi principali: il primo riguarda il meccanismo di "maturazione" degli mRNA; il secondo riguarda le modificazioni post-traduzionali delle proteine. La trascrizione di un gene codificante per una proteina dà origine a un trascritto primario che, attraverso un meccanismo complesso denominato *splicing*, può generare diversi mRNA "maturi" che sono tradotti in isoforme della stessa proteina che possono avere funzioni diverse. Le proteine, infine, possono subire modificazioni dopo essere state "tradotte" sui ribosomi: tale processo, chiamato "regolazione post-traduzionale", influenza enormemente l'attività e la stabilità delle proteine.

Trascrittoma: maturazione dell'RNA messaggero, *splicing* e *splicing* alternativo

La molecola trascritta dalla RNA polimerasi è un pre-RNA (chiamato anche hn-RNA o RNA eterogeneo nucleare), cioè una molecola di RNA che va incontro a maturazione prima di passare nel citoplasma ed essere tradotta sui ribosomi. Nel nucleo le sequenze introniche (non codificanti) vengono eliminate attraverso il processo di *splicing*, in cui le estremità degli introni (siti di *splicing*) vengono riconosciute, tagliate e gli esoni vengono ricuciti insieme dando luogo alla sequenza codificante completa. A maturazione completata, l'mRNA esce dal nucleo e può essere tradotto sui ribosomi. È evidente che i tagli degli introni devono avvenire in modo molto accurato per garantire che l'mRNA finale abbia una cornice di lettura corretta.

Allo stesso tempo, il meccanismo di *splicing* è stato selezionato anche per la sua flessibilità nella scelta dei siti di *splicing*. Questo permette alla cellula di "sperimentare" nuove proteine, modificando lo schema di *splicing* (includendo o escludendo un determinato esone/introne, mantenendone comunque l'ordine). Queste forme alternative di *splicing* sono molto comuni: il 70% dei geni umani ha *splicing* alternativi e, in molti casi, gli schemi di *splicing* di uno stesso pre-RNA sono molteplici. In tessuti o in stadi di differenziamento diversi di una stessa cellula, o in vari momenti dello sviluppo, lo stesso pre-RNA subisce *splicing* diversificati, generando proteine con funzioni differenti. Questa plasticità è dovuta alla presenza di fattori specifici che regolano l'accessibilità al taglio dei diversi siti di *splicing* e, quindi, lo schema dei tagli che vengono effettuati sulla molecola di pre-RNA. Il vantaggio è evidente: più proteine sono codificate da una stessa sequenza genica e, di conseguenza, più informazione è immagazzinata nel genoma.

Un gene, una proteina

L'esistenza dello *splicing* alternativo ha cancellato il dogma originario, un gene una proteina, e ha portato a definire il gene come una collezione lineare di esoni che vengono assemblati in molteplici combinazioni dallo *splicing*.

La fibronectina, ad esempio, è una proteina della matrice extracellulare con vari schemi di *splicing* tessuto-specifici (fig. 8.2). È presente nel tessuto connettivo e nel plasma. Contribuisce a organizzare la matrice extracellulare e regola l'inte-

Figura 8.2
Il gene della fibronectina contiene 50 esoni. Lo *splicing* alternativo del pre-RNA in tre diversi siti dà origine a più di 20 diverse isoforme di fibronectina con diverse proprietà. Le cellule che maggiormente sintetizzano la fibronectina sono i fibroblasti e il fegato. Lo *splicing* alternativo nella parte terminale determina la capacità deilla fibronectina di essere legata dai linfociti e, di conseguenza, l'adesione ai tessuti di questi ultimi.

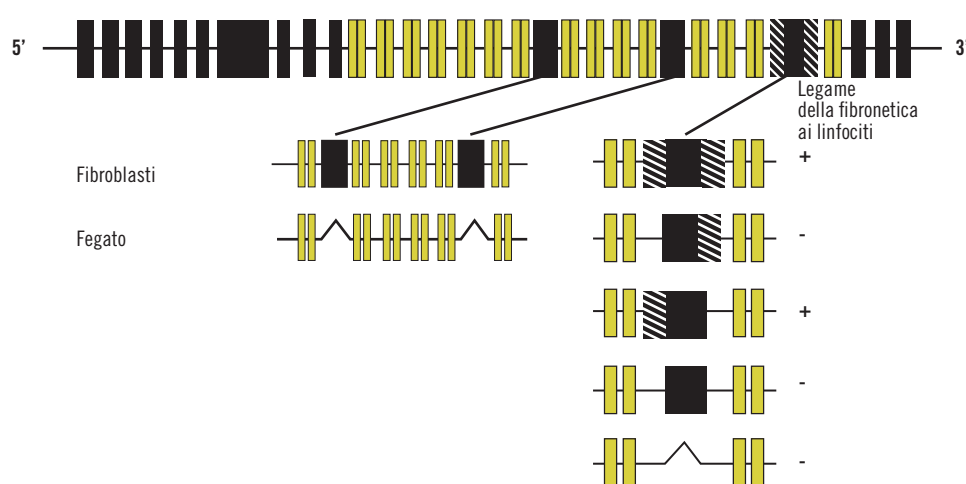
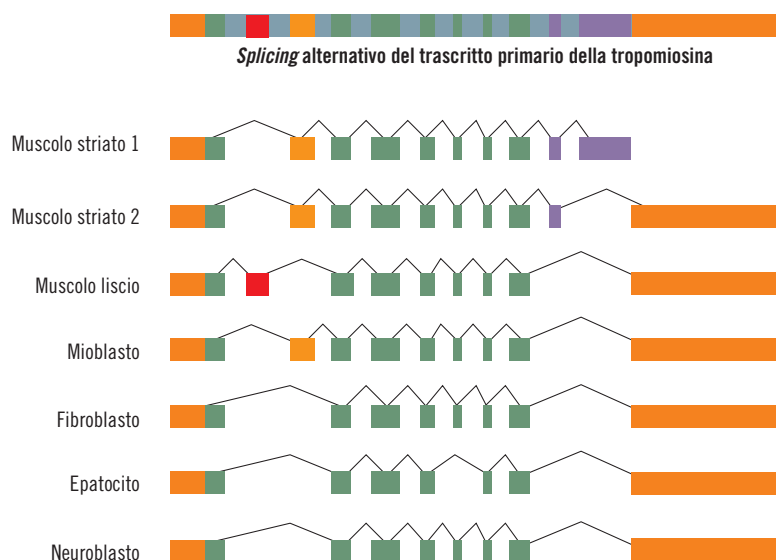



Figura 8.3
Il gene della tropomiosina contiene 12 esoni. Lo *splicing* alternativo del pre-RNA in diversi siti dà origine a 7 diverse forme di tropomiosina con diverse proprietà e in diversi tessuti.

razione con altre molecole della matrice e altre cellule; svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'adesione e della migrazione cellulare in processi fondamentali come l'embriogenesi, la metastatizzazione, la cicatrizzazione, il mantenimento dell'integrità dei tessuti.
La tropomiosina, una proteina implicata nel controllo della contrazione muscolare, è codificata da un gene contenente 12 esoni. Diverse modalità di *splicing* generano 7 isoforme diverse di tropomiosina nel muscolo scheletrico, nel muscolo liscio, nei fibroblasti del tessuto connettivo, nel fegato e nel cervello (fig. 8.3).

Modificazioni post-traduzionali

Le modificazioni delle proteine (fig. 8.4) aumentano la diversità dei gruppi funzionali ben al di là dei 20 tipi di aminoacidi esistenti. Tali modificazioni variano le proprietà funzionali delle proteine, rappresentano nuovi segnali di riconoscimento molecolare, "accendono" o "spengono" attività enzimatiche e controllano la stabilità e la localizzazione di proteine all'interno della cellula. Le modificazioni di proteine possono essere reversibili o irreversibili, fisiologiche o patologiche. Alcune modificazioni sono irreversibili: l'esempio più classico consiste nel processamento di proteine tramite rottura del legame peptidico catalizzata da proteasi, enzimi che degradano altre proteine. La modificazione di proenzimi tramite proteolisi specifica è comune nella produzione delle forme attive di enzimi digestivi, di

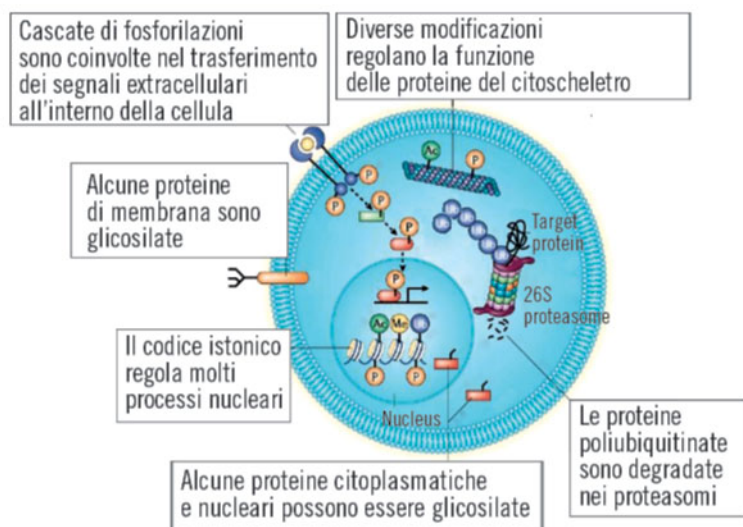



Figura 8.4
Alcune delle principali modificazioni post-traduzionali delle proteine.
Ac: acetilazione; Ub: ubiquitinazione; P: fosforilazione; Me: metilazione

ormoni, di proteine coinvolte nella coagulazione del sangue e in numerosi altri processi.

Alcuni esempi di modificazioni post-traduzionali

Ubiquitinazione (fig. 8.5)

L'ubiquitina è una piccola proteina di 76 aminoacidi molto conservata tra tutti gli eucarioti; il ruolo più noto dell'ubiquitinazione consiste nell' "etichettare" le proteine da avviare alla degradazione nei proteasomi. Negli ultimi anni si è però scoperto che l'ubiquitinazione di proteine è coinvolta in una miriade di processi, tra cui: la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi, la riparazione del DNA, il differenziamento, il trasporto di proteine. Il numero dei residui di ubiquitina legati alla proteina ne regola la funzione e il destino: se alla stessa proteina si legano molti residui di ubiquitina, questa viene per lo più spinta alla degradazione tramite i proteasomi; al contrario, il legame di pochi residui di ubiquitina (1-4) influenza la funzionalità della proteina e non la sua stabilità.

Figura 8.5
Aggiunta di ubiquitine a una proteina non correttamente formata e sua degradazione nel proteasoma.

Fosforilazione e defosforilazione

La fosforilazione di proteine è la modificazione post-traduzionale più frequente nel proteoma degli eucarioti. È stato valutato che circa un terzo delle proteine del proteoma umano sono fosforilate, e che esistono circa 500 enzimi in grado di fosforilare in modo specifico altre proteine e 150 capaci di de-fosforilarle. Come anticipato, gli enzimi fosforilanti sono chiamati proteine-chinasi (PK), mentre quelli che defosforilano sono denominati fosfatasi. La fosforilazione di proteine avviene anche nei procarioti, ma è estremamente più abbondante negli eucarioti.
Le proteine-chinasi catalizzano il trasferimento di un fosfato dell'ATP su residui di serina, treonina o tirosina con liberazione di ADP. Poiché la fosforilazione ha un'importante funzione regolativa, possiamo prevedere che esistano diverse strategie anche per eliminare i gruppi fosfato dalle proteine fosforilate o per spegnere l'attività delle chinasi. Il modo più diretto per eliminare gli effetti della fosforilazione di una proteina consiste nell'idrolizzare direttamente il gruppo fosfato dai residui degli aminoacidi fosforilati.

Acetilazione e metilazione

Nelle cellule eucariotiche molti processi possono essere regolati attraverso l'acetilazione e la metilazione di proteine. In particolare, l'acetilazione e la metilazione degli istoni sono molto rilevanti per modulare la struttura e la funzione della cromatina. Il nucleosoma (fig. 8.6) costituisce l'unità strutturale di base della cromatina: è una struttura nucleo-proteica costituita da 9 molecole istoniche: 1 copia dell'istone H1 e due copie ciascuna degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 che formano il "core" del nucleosoma che ha il ruolo di compattare il DNA nel nucleo delle cellule.

Figura 8.6
Struttura del nucleosoma: due giri di DNA avvolti intorno a un ottamero di istoni (H2A, H2B, H3, H4). Le modificazioni istoniche avvengono sulle estremità delle proteine che sporgono dal nucleosoma.

Tutti e quattro gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 che formano il "core" possono essere acetilati e/o metilati su specifici tipi di aminoacidi. È importante aggiungere che le modificazioni istoniche sono tra loro inter-connesse: ad esempio, una certa modificazione su uno specifico aminoacido può avvenire solo se un altro residuo sulla stessa molecola è stato precedentemente modificato.
Il complesso delle modificazioni istoniche ha una grande rilevanza nei meccanismi di epigenetica, cioè i meccanismi che influenzano le funzioni del genoma, ma non comportano alcuna modificazione nella sequenza del DNA. Il codice delle modificazioni istoniche consente alla cellula di "interpretare" in più modi il codice genetico sul DNA, attuando schemi di espressione genica specifici (ad es. attivazione o silenziamento di un particolare gene o gruppo di geni) in risposta a un dato stimolo o una data condizione ambientale. Queste modificazioni degli istoni possono essere trasmesse di generazione in generazione e consentono quindi il trasferimento dello stato funzionale della cromatina alle cellule figlie.

Glicosilazione

La glicosilazione consiste nell'aggiunta di una catena laterale di carboidrati a un aminoacido, e le proteine così modificate sono definite glicoproteine: tra queste rientrano molte proteine che svolgono la loro funzione in ambiente extracellulare e che, quindi, vengono secrete dalle cellule o sono esposte sulle membrane cellulari. La glicosilazione inizia nel reticolo endoplasmatico (RE) e viene completata nell'apparato di Golgi. Questo tipo di proteine, durante la sintesi, viene trasferito nelle membrane o nelle cisterne del RE: da qui passa nell'apparato di Golgi da cui è indirizzato alla destinazione definitiva.

Per saperne di più

IL CODICE DEGLI ISTONI

Acetilazione e metilazione riguardano molte proteine, ma in particolare, gli istoni che sono le proteine più modificate a livello post-traduzionale (si parla di codice degli istoni).
L'acetilazione di proteine riguarda essenzialmente residui di lisina e arginina, mentre la metilazione può avvenire anche su altri aminoacidi (fig. 8.7). Non solo: le metilazioni possono prevedere l'aggiunta di 1, 2 o 3 gruppi metilici.
Nell'ottamero istonico, l'istone H3 è quello più fortemente modificato a livello post-traduzionale. Considerando tutte le possibili modificazioni, il numero di isoforme proteiche diverse per una molecola di istone H3 è enorme: 110 592 possibili combinazioni di modificazioni post-traduzionali! Come già detto, inoltre, gli amminoacidi possono essere mono- di-, o tri-metilati e va considerato che tutte queste modificazioni possono essere teoricamente diverse nei circa 10^7 nucleosomi presenti sul genoma umano, ciascuno contenente due copie dell'istone H3. Esistono poi gli altri istoni e le loro modificazioni! Il numero di possibili combinazioni di modificazioni nel genoma diventa, quindi, astronomico! Questo spiega come le cellule possono adattare, con estrema dinamicità, gli schemi di espressione genica a diverse condizioni.

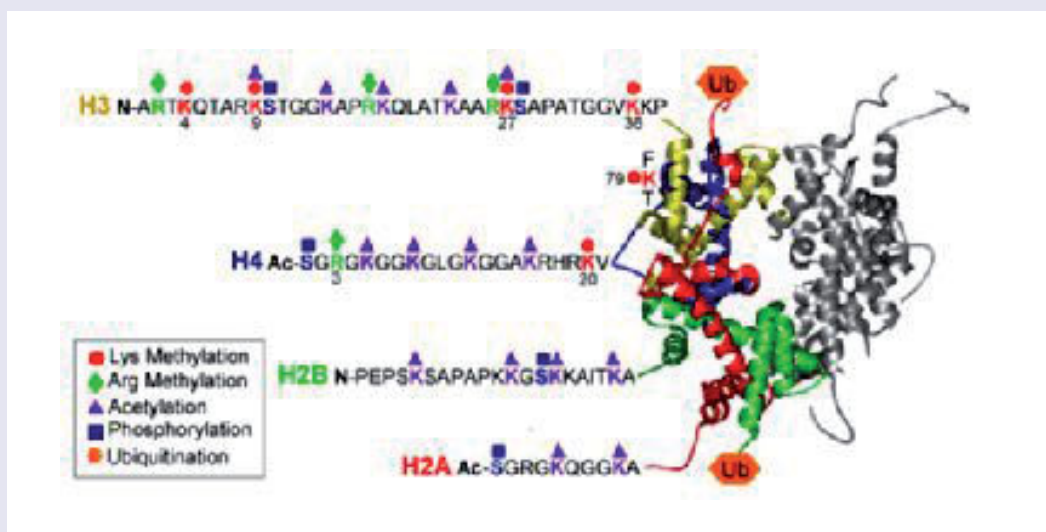



Figura 8.7
Alcuni esempi di modificazioni istoniche. K: lisina; R: arginina; S: serina.

La cellula corre ai ripari
Meccanismi di riparazione del DNA

Premessa

In tutti gli eucarioti, le cellule attivano, in risposta a danni al DNA, uno specifico meccanismo cellulare, chiamato **checkpoint**, la cui funzione è essenzialmente quella di rallentare il ciclo cellulare per offrire alle cellule più tempo per riparare le lesioni sul DNA. Il DNA è danneggiato da svariati agenti chimico-fisici presenti nell'ambiente, tra cui le radiazioni ultraviolette nella luce del sole e sostanze chimiche presenti in diverse lavorazioni industriali, nella nostra dieta o nel fumo di sigaretta. Oltre a questi danni causati da agenti così detti "esogeni", il DNA è danneggiato anche da radicali liberi dell'ossigeno che si generano nelle cellule durante il normale metabolismo cellulare (si parla di "agenti endogeni"). Per nostra fortuna, nelle cellule si sono evoluti, insieme ai *checkpoint* sopra citati, tutta una serie di meccanismi di riparazione dei danni molto efficienti che si prendono cura di specifiche lesioni prodotte sul DNA. Per avere un'idea del fenomeno, basti pensare che il DNA di ogni cellula umana subisce giornalmente alcune decine di migliaia di lesioni che, se non riparate, portano a mutazioni, riarrangiamenti e perdita di cromosomi, tutti fenomeni connessi all'insorgenza di tumori e altre patologie nell'uomo. La stabilità e l'integrità del genoma sono così vitali per la cellula che il DNA è l'unica molecola per cui si sono evoluti meccanismi di riparazione: le altre molecole, se danneggiate, vengono buttate via!!

In risposta a danni al DNA, le cellule aumentano l'efficienza dell'attività di riparazione trascrivendo geni che codificano per proteine riparative o richieste per il *checkpoint,* incrementando, di conseguenza, la loro quantità all'interno delle cellule. L'attività delle proteine riparative e di *checkpoint* è modulata anche a livello post-traduzionale, cioè queste proteine sono modificate chimicamente dopo essere state sintetizzate (vedere più avanti).

Lo scenario

Nell'esperimento analizzeremo il livello di una particolare proteina di lievito: il prodotto del gene *RAD53*, una proteina-chinasi che gioca un ruolo cruciale nella risposta cellulare a tutti i tipi di danno sul DNA. In risposta a danni al DNA, la proteina Rad53 viene specificamente fosforilata e tale modificazione è visibile sperimentalmente in quanto, aumentando il peso molecolare della proteina, ne rallenta la mobilità elettroforetica. Questi meccanismi di riparazione sono così utili e importanti che si sono conservati nel corso dell'evoluzione dal lievito all'uomo! Come potete osservare nella tabella 8.1 ci sono diverse proteine che hanno la stessa funzione nell'uomo e nel lievito, anche se hanno nomi diversi.

Un tipico *checkpoint* comprende tre componenti:

- i sensori: proteine che rilevano i segnali causati sul DNA dalle varie lesioni;
- i trasduttori: per lo più delle proteine-chinasi (tra cui Rad53) che amplificano e trasmettono il segnale nell'ambito di una cascata di trasduzione del segnale;
- gli effettori: per lo più proteine che agiscono sul controllo del ciclo cellulare.

Elettroforesi: la tecnica usata per separare le molecole proteiche

La purificazione di una proteina consiste nel suo

Tabella 8.1
Proteine coinvolte nel *chekpoint* da danni sul DNA in uomo e in lievito

PROTEINE	UOMO	LIEVITO
Sensori	complesso 9-1-1 ATM e ATR (chinasi)	complesso 9-1-1 Tel1 e Mec1 (chinasi)
Trasduttori	Chk1 e Chk2 (chinasi)	Chk1 e Rad53 (chinasi)
Effettori	numerose proteine che controllano per lo più la progressione del ciclo cellulare (tra le quali, in uomo, la famosa p53, nota come "guardiano" del genoma	

isolamento da una miscela eterogenea contenente altre proteine, o anche acidi nucleici, polisaccaridi, lipidi e molecole più piccole (zuccheri, peptidi, aminoacidi, ormoni etc.). La purificazione sfrutta le differenze nelle proprietà chimico-fisiche tra la molecola che si vuole purificare e le altre presenti nella miscela.
Alcuni parametri utilizzabili sono:

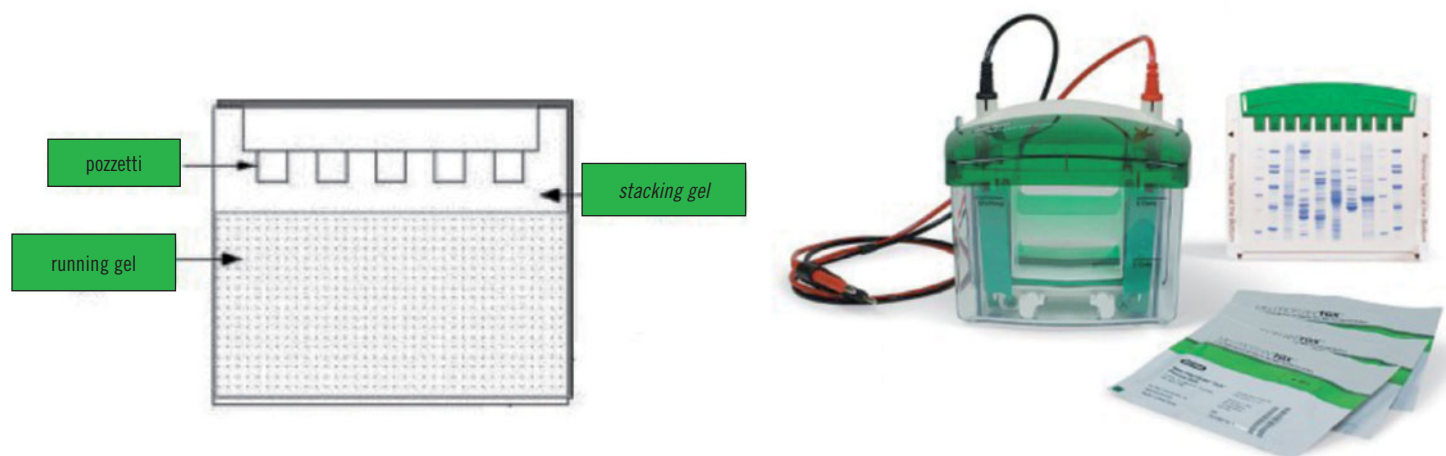
- la dimensione della proteina e la sua carica;
- solubilità, densità, idrofobicità;
- capacità di legare metalli o altre molecole;
- presenza di modifiche post-traduzionali;
- altre proprietà (per es. la termolabilità o termostabilità).

L'elettroforesi in un campo elettrico è, però, la tecnica più utilizzata per separare tra loro miscele di proteine di diverse dimensioni e peso molecolare. La separazione delle varie componenti proteiche avviene, solitamente, su gel verticali di poliacrilammide, con la porosità più idonea alle dimensioni delle proteine da separare.
La velocità di migrazione su gel di una proteina dipende dall'intensità del campo elettrico applicato, dal peso molecolare (dimensione) e dalla carica della proteina stessa. La carica netta di una proteina dipende, a sua volta, dal pH del tampone utilizzato per la corsa elettroforetica.
Le tecniche di separazione elettroforetiche possono essere divise in due categorie principali: elettroforesi di proteine in condizioni native o in condizioni denaturate. In condizioni native le proteine conservano la loro conformazione e la separazione avviene sulla base del rapporto carica/massa. La conservazione della conformazione è importante per il mantenimento dell'attività biologica: proteine estratte da gel nativi sono solitamente attive e possono essere utilizzate per ulteriori esperimenti.

Allestimento di un gel per elettroforesi in SDS

Una tecnica molto utilizzata in laboratorio è, la separazione di proteine in condizioni **denaturanti** in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS) e agenti riducenti: si parla di tecnica SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato - PoliAcrilammide Gel Elettroforesi). In presenza di SDS, detergente fortemente ionico, e altre condizioni sperimentali specifiche, la struttura secondaria e terziaria delle proteine viene, di fatto, distrutta. I polipeptidi sono ricoperti da cariche negative (il detergente SDS conferisce una carica elettrica negativa in media ogni 2 aminoacidi), permettendo la migrazione delle proteine verso l'anodo (polo positivo), con una velocità che dipende dal loro peso molecolare (dimensioni). Ne consegue che, disponendo di proteine di peso molecolare noto, è possibile costruire una curva standard che permette di calcolare il peso molecolare di una proteina ignota in funzione della sua distanza di migrazione.
Un tipico allestimento di un gel per elettroforesi in SDS prevede (fig. 8.8):

- uno "*stacking*" gel (o gel di impaccamento) di acrilammide al 4%: è la parte superiore del gel; la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutte le proteine presenti nella miscela inizino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza;
- un "*running*" gel (o gel di separazione) di acri-

Figura 8.8
Allestimento di un gel di acrilammide e apparecchiatura per elettroforesi in SDS.

lammide al 10% : è la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine dei vari campioni in base al loro peso molecolare. È composto dagli stessi ingredienti dello *stacking* gel, ma in quantità diverse e con un pH diverso. In particolare, la concentrazione di acrilammide varia tra *stacking* gel e *running* gel. Infatti, lo *stacking* gel serve solo a impaccare le proteine alla "griglia di partenza" e per ottenere ciò basta una concentrazione bassa di acrilammide; nel *running* gel, invece, si vogliono separare le proteine e, quindi, la scelta della concentrazione di acrilammide è in funzione dell'ambito di peso molecolare che si vuole analizzare. La concentrazione di acrilammide determina la dimensione dei pori nel gel: concentrazioni maggiori portano a pori di dimensioni minori.

Tutta la procedura di allestimento del gel può essere evitata, in quanto sono disponibili in commercio gel "*precast*", già polimerizzati e con i pozzetti preformati, pronti all'uso.
Scaricate le schede del protocollo per l'elettroforesi delle proteine e per il *western blotting*.

Come si allestisce una corsa elettroforetica per proteine

L'apparato di base per l'elettroforesi verticale è costituito da due lastre di vetro rettangolari di 8 x 10 cm, inserite verticalmente nel supporto per la gelificazione; le lastre sono separate da due spaziatori di plastica e chiuse da pinze. Nello spazio che si genera (circa 1 mm di spessore) si versano e si lasciano gelificare prima la soluzione di acrilammide per il gel di separazione (inferiore) e poi quella per il gel di impaccamento (superiore). Quando questo non è ancora gelificato, si introduce un pettine di teflon dello stesso spessore degli spaziatori, allo scopo di formare i pozzetti in cui verranno caricati i campioni (fig. 8.8). Il supporto contenente il gel di poliacrilammide così preparato viene poi immerso nella camera per la corsa elettroforetica contenente il tampone per la separazione delle proteine. I campioni di proteine, più densi perché contengono glicerolo, sono depositati nei pozzetti contenenti il tampone di corsa.

Dopo l'elettroforesi, le proteine (se presenti in quantità sufficienti) possono essere visualizzate mediante la colorazione con Blu di Coomassie (fig. 8.9). La miscela di proteine contenuta in un estratto cellulare non purificato contiene tanti polipeptidi che, dopo separazione e colorazione, danno origine a un numero molto elevato di bande non facilmente distinguibili una dall'altra. Inoltre, alcune proteine sono presenti in basse quantità e non sono rilevabili con una semplice colorazione.

Figura 8.9
Colorazione di proteine con Blu di Comassie dopo separazione elettroforetica; nelle corsie 1 e 8 sono caricati i marcatori di peso molecolare.

Western blotting

Per individuare ed evidenziare nella miscela di proteine presente in un estratto cellulare la proteina a cui si è interessati si ricorre molto spesso a tecniche di "*blotting*"; con tale termine si intende il trasferimento di materiale biologico su supporti, tipo nylon o nitrocellulosa, che possono essere facilmente maneggiati e incubati con opportune sonde che possono ibridare (formare legami) con le molecole d'interesse. Nel caso di una miscela di proteine, è possibile evidenziare inequivocabilmente la proteina d'interesse (dopo separazione elettroforetica) se si dispone di un anticorpo contro tale proteina (vedi box Per saperne di più *Interazione antigene-anticorpo*). A tale scopo, le proteine separate mediante SDS-PAGE sono trasferite elettricamente su un foglio di nitrocellulosa. Il foglio è poi incubato in presenza di un anticorpo specifico (anticorpo primario) contro la proteina d'interesse e il complesso proteina-anticorpo formatosi sul foglio è evidenziato utilizzando un anticorpo secondario (cioè che riconosce il primo anticorpo) marcato, o in grado di conferire una colorazione specifica, o una chemioluminescenza che possono essere monitorate su una lastra fotosensibile. L'intera procedura prende il nome di "*western blotting*"(fig. 8.12).
Le tecniche di marcatura degli anticorpi sono

Per saperne di più

INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

La tecnica qui utilizzata per evidenziare una particolare proteina "sfrutta" la reazione antigene-anticorpo che avviene normalmente in un organismo. Vale la pena ripassare alcuni concetti fondamentali. In seguito all'ingresso nell'organismo di microrganismi estranei, nel sistema immunitario dei vertebrati, i linfociti B si attivano producendo molecole, gli anticorpi o immunoglobuline, in grado di riconoscere e legare selettivamente i determinanti antigenici (Ag) presenti sulle molecole estranee. Le funzioni principali degli anticorpi sono:
legarsi agli antigeni e neutralizzarli;
contribuire a eliminare gli agenti patogeni con l'aiuto di macrofagi;
formare complessi con gli agenti patogeni che attivano direttamente una forma di risposta immunitaria (i fattori del complemento) che porta alla lisi del microrganismo legato.

Gli anticorpi hanno la caratteristica fondamentale di riconoscere gli antigeni in modo molto specifico. Questa caratteristica è ampiamente sfruttata sperimentalmente e gli anticorpi vengono utilizzati quali sonde ottimali per studiare la localizzazione e la biochimica di proteine e altri antigeni complessi, così come per effettuarne il dosaggio e la purificazione.

Figura 8.10
a) Un tipico anticorpo ha forma di Y e ha due identici siti di legame per l'antigene su ciascun braccio della Y. La proteina è formata da 4 catene polipeptidiche (2 catene pesanti H e 2 catene leggere L) tenute insieme da ponti disolfuro. Ciascuna catena è composta da domini immunoglobulinici: un dominio variabile alla estremità –NH2 terminale (ombreggiato in azzurro), uno (nella catena L) e tre (nella catena H) domini costanti (ombreggiati in grigio).
b) Modello a nastro di una catena L che mostra (in rosso) le parti del dominio VL maggiormente coinvolte nel legame con l'antigene.

Struttura degli anticorpi

Una molecola di anticorpo (Ab, dall'inglese antibody) ha una struttura quaternaria (fig. 8.10a) costituita da due catene pesanti di circa 440 aminoacidi e due catene leggere di 220 aminoacidi uguali a due a due. Catene pesanti (H, dall'inglese heavy) e leggere (L, dall'inglese light) sono tenute insieme da ponti disolfuro (S-S).
Ciascuna catena comprende una regione variabile -NH2 terminale, in cui sono localizzate le sequenze aminoacidiche che concorrono alla formazione del sito di legame, e una regione costante -COOH terminale. Le estremità -NH2 terminali di catene H e L accoppiate formano due siti di legame per l'antigene. Le catene leggere e pesanti sono costitute da **domini**, ciascuno dei quali è lungo 110 aminoacidi e caratterizzato dalla presenza di due cisteine che formano un ponte disolfuro che stabilizza la struttura del dominio. La catena L (fig. 8.10b) ha due domini (un dominio variabile VL e un dominio costante CL) mentre la catena H ha un dominio variabile (VH) e tre domini nella regione costante (CH1, CH2, CH3).

Antigeni

Gli antigeni sono sostanze in grado di interagire con anticorpi; il sito di interazione con l'anticorpo viene indicato con il termine di "epitopo" o determinante antigenico. Gli immunogeni (o antigeni) più comuni e potenti sono le proteine. Le singole proteine hanno più di un epitopo e possono quindi essere riconosciute da anticorpi con specificità diverse.

Legame antigene-anticorpo

L'anticorpo lega con affinità più o meno elevata l'epitopo mediante formazione di legami ionici, legami idrogeno, interazioni idrofobiche (fig. 8.11). Se l'antigene è rappresentato da una proteina, l'epitopo che stabilisce legami con il sito variabile dell'anticorpo è formato da circa 6-10 aminoacidi. Il legame Ab/Ag è stabile a condizioni di pH e forza ionica fisiologici.
A pH estremi, il legame si rompe. Lo stesso accade aumentando la concentrazione salina o aggiungendo detergenti in grado di indebolire i legami idrofobici. Tali condizioni variano a seconda sia dell'antigene che dell'anticorpo.

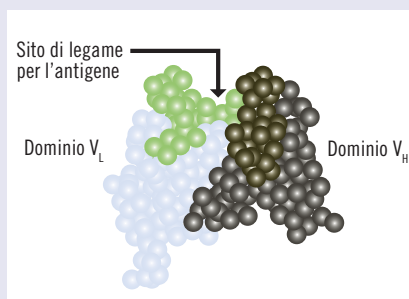
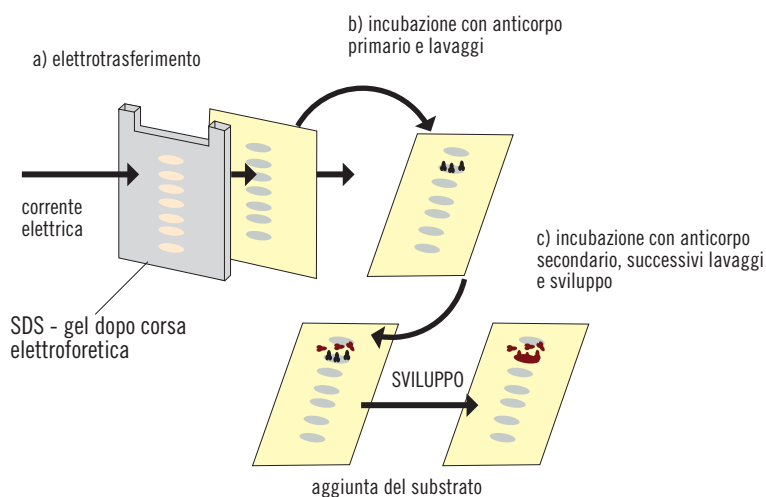



Figura 8.11
Nella molecola di anticorpo, il sito di legame per l'antigene è formato dai domini V_H e V_L. In verde e in arancio i residui amminoacidici coinvolti nella formazione del sito di legame.

Figura 8.12
In alto. Apparecchiatura per *western blotting*. In basso. I passaggi di un *western blotting*. *a*) Elettrotrasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide a un foglio di nitrocellulosa. *b*) Incubazione con anticorpo primario. *c*) Incubazione con anticorpo secondario marcato e rilevamento.

molteplici:

- radioattività;
- legame con un enzima (il cui substrato sia in grado di dare una colorazione specifica);
- biotinilazione (e rilevamento con avidina marcata);
- chemioluminescenza in grado di dare un segnale su una lastra fotosensibile.

Gli anticorpi primari si ottengono dal siero di animali (in genere topo/ratto/coniglio/capra) iniettati con la proteina di interesse. Gli anticorpi del siero animale sono policlonali (ossia sono diretti contro diversi epitopi della proteina usata come immunogeno) e possono quindi avere delle reazioni crociate con altre proteine (che condividono epitopi con la proteina di interesse). Per una specificità maggiore si usano anticorpi monoclonali, prodotti in vitro immortalizzando singole cellule della milza di animali immunizzati. Come anticorpo secondario si usa un siero di animale (di specie diversa da quella in cui è stato prodotto l'anticorpo primario), immunizzato con anticorpi della specie dell'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è, quindi, un anticorpo diretto contro la parte costante di un anticorpo di specie diversa.

Dopo il trasferimento (*blotting*) su filtro di nitrocellulosa, si effettuano i seguenti passaggi.

1. Saturazione: nel processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana, che vengono bloccati rivestendo la membrana con una miscela di proteine non specifiche. Questo evita il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti. Si utilizza latte o albumina bovina (BSA).
2. Incubazione con anticorpo primario: la mem-

brana viene immersa in una soluzione che contiene l'anticorpo contro la proteina di interesse. Poiché tutti i siti della membrana che legano proteine sono bloccati, l'anticorpo aderisce alla membrana solo se si lega con il suo antigene specifico.

3. Lavaggi: permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato il proprio antigene. La membrana viene lavata con una soluzione contenente un detergente (*tween 20*), mantenendola in agitazione su una piastra basculante. È importante effettuare più lavaggi, cambiando diverse volte la soluzione di lavaggio.
4. Incubazione con anticorpo secondario: la membrana viene immersa in una soluzione che contiene un anticorpo in grado di reagire con qualunque anticorpo della stessa fonte biologica del primario.
   Esempi:
   - Ab primario di coniglio (*rabbit*)
   - Ab secondario: capra anti-coniglio (*goat anti-rabbit*)
   - Ab primario di topo (*mouse*)
   - Ab secondario: capra anti-topo (*goat anti-mouse*)
5. Lavaggi: permettono di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha legato l'anticorpo primario. Si utilizza la stessa soluzione con detergente utilizzata nello *step* 3; l'ultimo lavaggio avviene invece in TBS perchè il *tween 20* può inibire la reazione utilizzata per la rivelazione della proteina.
6. Rilevazione della proteina: l'anticorpo secondario è accoppiato covalentemente a un enzima che catalizza una reazione cromogena quando la membrana viene incubata con il substrato dell'enzima accoppiato.

Analisi dei risultati

Gli stessi campioni 1 e 2 vengono caricati su due gel (gel 1 e gel 2). I risultati sono illustrati in figura 8.13:

PM: *marcatore* di peso molecolare di proteine
Campione 1: estratto proteico proveniente dal ceppo di lievito normale
Campione 2: estratto proteico proveniente dal ceppo di lievito irraggiato con raggi UV.

Dopo la corsa elettroforetica il gel 1 viene colorato con il Blu di Coomassie e si ottengono una serie di bande corrispondenti alle maggiori componenti proteiche dei due estratti; non sono evidenziabili differenze tra il campione 1 e il campione 2.
Dopo *western blotting* del gel 2, l'immunodecorazione della membrana con l'anticorpo anti-Rad53 mostra che la proteina è presente in entrambi gli estratti, ma nel campione 2 ha un peso maggiore (é più in alto) dovuto alla sua fosforilazione.
Colorando la membrana, dopo *western blotting*, con Rosso Ponceau, si osserva una distribuzione di bande del tutto sovrapponibile a quella ottenuta con il Blu di Coomassie nel gel 1, dimostrando che c'è stato un completo trasferimento delle proteine durante il *western blotting*.

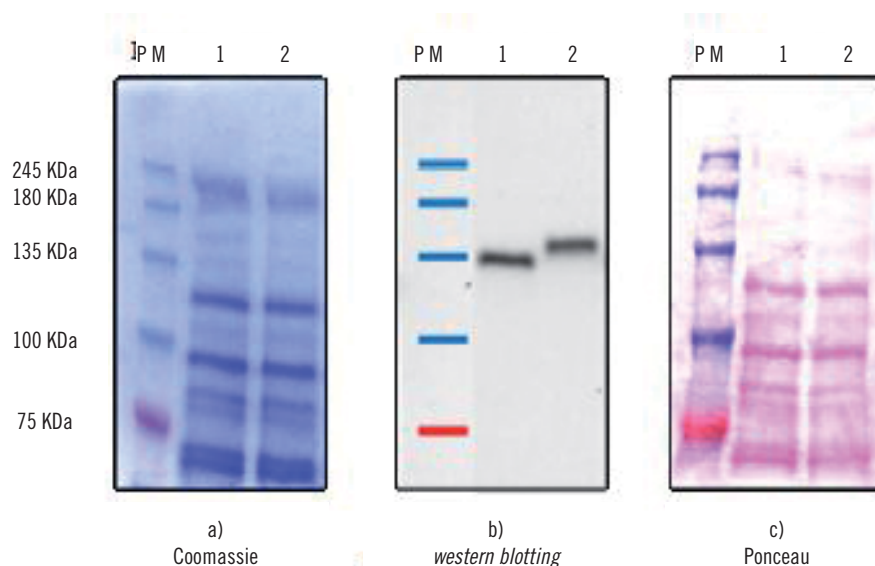



Figura 8.13
a) Gel di proteine colorato con Blu di Coomassie.
b) Risultato del *western blotting*: in evidenza solo la proteina di interesse non modificata (1) e modificata (2).
c) Colorazione del gel con Rosso Ponceau dopo il trasferimento.

9. Surfing tra i genomi

In questa attività impareremo a esplorare il genoma umano utilizzando le informazioni contenute in alcune delle banche dati biomediche disponibili online.
Metteremo a confronto l'organizzazione e le caratteristiche di genomi di organismi diversi, scopriremo le corrispondenze esistenti fra i cromosomi umani e quelli di altri esseri viventi, impareremo a trovare un gene all'interno del genoma e a scoprirne struttura e funzione.

Per poter svolgere questa attività è indispensabile avere a disposizione un computer collegato a internet e un percorso guida, con indicati i siti dove trovare le informazioni.

Anche i genomi vanno in banca

Il sito da cui partiremo per l'esplorazione del genoma umano è www.ensembl.org (fig. 9.1). **Ensembl** (un gioco di parole fra *ensemble*, cioè insieme, e EMBL, la sigla del *European Molecular Biology Laboratory*) è un progetto nato dalla collaborazione tra Sanger Center (uno dei più importanti centri di ricerca sul genoma a Cambridge) e EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) per sviluppare un sistema software di annotazione automatica dei genomi animali. Con il termine "annotazione" si intende l'inserimento di tutte le informazioni riguardanti la funzione di una determinata sequenza di DNA. Ensembl aggiorna i dati almeno dieci volte in un anno, ma nel sito si possono ritrovare comunque le versioni precedenti (Ensembl Pre!), nel riquadro *Browse a Genome* che si trova a sinistra della home page. Le immagini contenute in questa attività si riferiscono alla versione (*release*) 64, aggiornata a settembre 2011.

Passiamo subito a esplorare il genoma umano utilizzando l'interfaccia fornita da Ensembl, esattamente come fanno quotidianamente moltissimi ricercatori impegnati in studi di Biologia e Genetica molecolare. Per iniziare, fate ora click su ***Human***, nel riquadro *Browse a Genome*.

Conoscenze propedeutiche

- DNA e cromosomi
- Cariotipo
- Geni e struttura
- Esoni-introni

Figura 9.1
Home page del sito Ensembl; in basso a destra, in evidenza, il numero della versione disponibile e la data dell'ultimo aggiornamento dei dati, in questo caso settembre 2011.

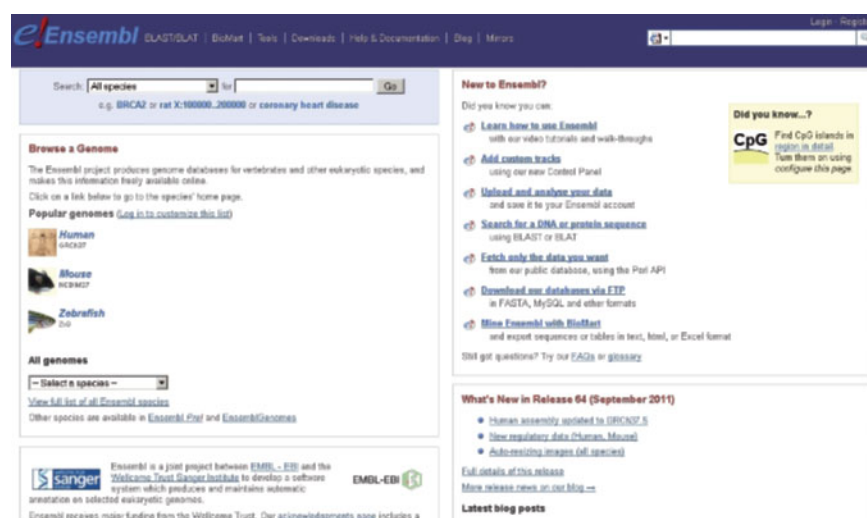
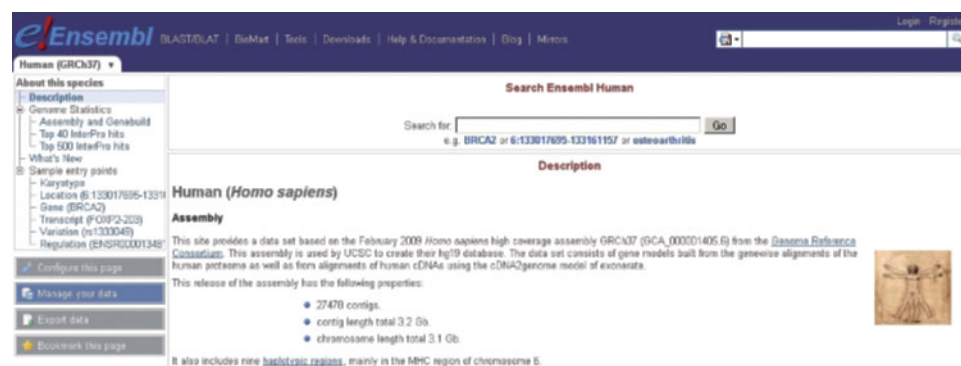



Figura 9.2
Schermata dedicata al genoma umano; a sinistra in blu i link utili per avere ulteriori notizie sul genoma umano.

Si apre la pagina relativa al genoma umano (fig. 9.2): poche righe fanno riferimento alla provenienza dei dati presenti nella corrente versione di Ensembl.
Fate click su ***Karyotype***, nella colonna di sinistra: si apre una nuova pagina, che permette di raccogliere varie informazioni sui cromosomi umani. In alto si ha una rappresentazione grafica del cariogramma umano (fig. 9.3), con gli ideogrammi dei 22 cromosomi autosomici e di quelli sessuali; con MT viene indicato il genoma mitocondriale. Le linee nere o grigie sui cromosomi rappresentano le "bande", regioni cromosomiche che avendo differenti proprietà fisico-chimiche si colorano in modo diverso dopo il trattamento con coloranti specifici.
Le bande sui cromosomi possono essere considerate come punti di riferimento, dato che sono specifiche per ogni cromosoma; gli scienziati le hanno usate in passato per definire le diverse regioni cromosomiche e, ancora oggi, i citogenetisti utilizzano diverse tecniche di bandeggio per studiare i cromosomi (vedi Esercitazione Analisi cromosomiche).
In basso sono evidenziati i dati che riguardano il genoma umano. La sua sequenza è considerata oggi sufficientemente stabile, così che i tre maggiori browsers genomici (**NCBI**, **Ensembl** e **UCSC Genome Browser**) si sono accordati al fine di identificare e annotare ciascun gene con un codice unico valido per tutti (gene ID).
Si contano 3 283 481 986 paia di basi (*Base Pairs*), 20 469 *Known protein-coding genes* (geni noti che codificano proteine) e 431 "*Novel protein-coding genes*", cioè geni previsti dall'analisi al computer, ma che non sono ancora stati verificati sperimentalmente. A volte le previsioni bioinformatiche possono non essere corrette e l'unico modo per provare l'esistenza di un nuovo gene è la dimostrazione sperimentale in laboratorio! (*nota*: i dati si riferiscono alla versione 64 di Ensembl, settembre 2011, e potrebbero variare in versioni più recenti)
Gli pseudogeni mantengono alcune delle caratteristiche proprie dei geni (ad esempio, essere preceduti da sequenze promotrici o avere siti di *splicing*), ma non sono più funzionanti, perché hanno perso la capacità di essere espressi a causa di eventi genetici (mutazioni) che hanno creato codoni di stop o slittamenti di lettura del codice.
Tornate sulla home page di Ensembl e cliccate su **Mouse** e poi su **Karyotype**, si aprirà la pagina relativa al cariotipo del topo con il suo tipico bandeggio. Vedrete che il topo ha un numero inferiore di cromosomi (19 cromosomi autosomici + X, Y).
Inoltre tutti i cromosomi sono acrocentrici, con il centromero a un'estremità.
Tornando alla pagina iniziale e cliccando su *View full list of all Ensembl species* si possono controllare anche altre specie (cane, pollo ecc.): noterete che non sempre sono presenti i cariotipi con i cromosomi o alcuni di questi non sono rappre-

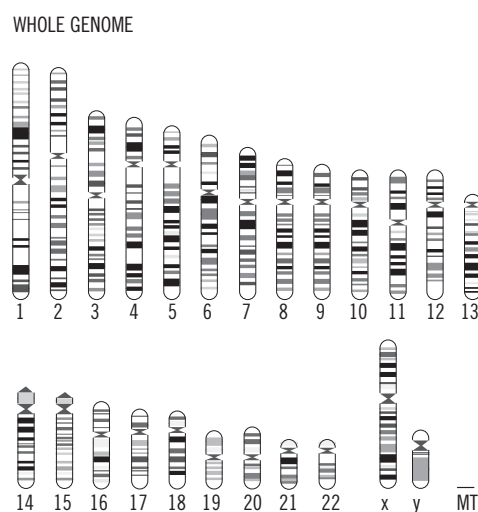



Figura 9.3
Rappresentazione del cariotipo umano con bandeggi.

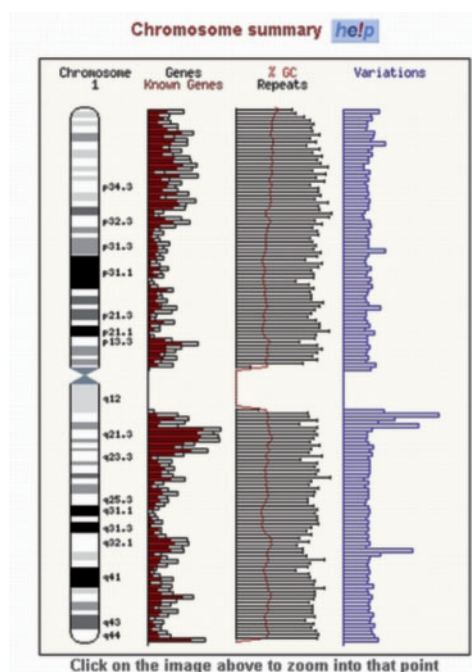



Figura 9.4
Cromosoma 1 umano osservato nel dettaglio.

sentati nel cariotipo della specie, oppure, ancora, sebbene presenti, non sono bandeggiati. Questo significa che un cromosoma è stato poco annotato o che non ci sono informazioni sui geni in esso contenuti o, infine, che il bandeggio non è significativo per rintracciare zone specifiche.
Tornate ora alla home page di Ensembl e all'*Homo sapiens* e provate a osservare un cromosoma più da vicino, per esempio il cromosoma 1: cliccando sopra di esso si apre una tendina e scegliendo ***Chromosome summary*** si accede a una visione più dettagliata del cromosoma e di alcune sue caratteristiche (fig. 9.4). L'ideogramma del cromosoma riporta annotazioni di tipo citogenetico. Si possono vedere le sigle che sono state assegnate ad alcune delle bande con numeri crescenti dal centromero verso le estremità telomeriche, rispettivamente sul braccio corto **p** (*petit*) e sul braccio lungo **q.** La colonna immediatamente a destra mostra la densità genica, cioè quanti geni sono presenti in una regione specifica del cromosoma e, in particolare, la parte rossa dell'istogramma mostra la percentuale di geni noti sul totale dei geni previsti. Nota che ci sono regioni con un numero di geni molto alto, altre con un numero molto basso e altre ancora senza geni (chiamate "deserti"), tra cui la zona del centromero. (Ricordiamo che solo il 2% circa dell'intera sequenza del genoma umano contiene sequenze codificanti. I geni sono per lo più "immersi" in lunghe sequenze non codificanti, il cui significato non è ancora del tutto compreso, talora chiamate *junk DNA*, o DNA spazzatura).
La seconda colonna mostra la percentuale di sequenze ripetute mentre la linea rossa quella di basi azotate GC. La colonna in blu indica la distribuzione delle variazioni, o **polimorfismi**, del DNA.
Nella parte in basso della schermata trovi altre informazioni sul cromosoma 1. Ci sono 2.002 *Known Protein-coding Genes*, e 26 *Novel Protein-Coding genes*, cioè geni predetti con le analisi al computer ma che non sono ancora stati validati sperimentalmente (fig. 9.5).

Chromosome Statistics

Length (bps):	249,250,621
Known Protein-coding Genes:	2,002
Novel Protein-coding Genes:	26
Pseudogene Genes:	1,091
miRNA Genes:	134
rRNA Genes:	66
snRNA Genes:	221
snoRNA Genes:	145
Misc RNA Genes:	106
SNPs:	2,714,765

Figura 9.5
Informazioni sul cromosoma 1: lunghezza in paia di basi, numero di geni conosciuti, numero di geni predetti, pseudogeni, geni per micro RNA (miRNA), per RNA ribosomiali (rRNA), per piccoli RNA nucleari (small nuclear RNA, snRNA), per piccoli RNA nucleolari (small nucleolar RNA snoRNA), per miscellanea di RNA (MiscRNA), numero di polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs).

È possibile visualizzare altri cromosomi aprendo la tendina posta sotto la rappresentazione grafica e scegliendo il numero del cromosoma.

La Genomica comparativa per seguire l'evoluzione

Attraverso i nuovi strumenti bioinformatici della genomica comparativa è possibile seguire le tracce dell'evoluzione sulla struttura e la funzione dei genomi Cliccando nel riquadro di sinistra su ***Synteny***, possiamo anche seguire la ***chromosome synteny*** cioè l'associazione di gruppi di geni, mettendo a confronto cromosomi di specie differenti. Troveremo che intere regioni cromosomiche risultano conservate in specie diverse.

Cromosomi di topo e di uomo

Per confrontare, ad esempio, il cromosoma 1 umano con i cromosomi di topo cliccate a sinistra su *Synteny*. È evidente come interi gruppi di sintenia, cioè regioni cromosomiche, sono rintracciabili in

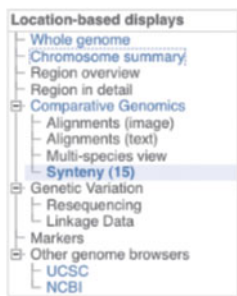



Figura 9.6
Il cromosoma 1 umano, in posizione centrale e, ai lati, grafica della distribuzione sui cromosomi di topo dei vari gruppi di sintenia.

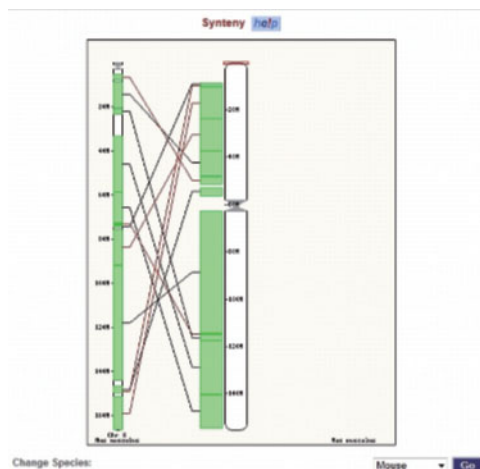
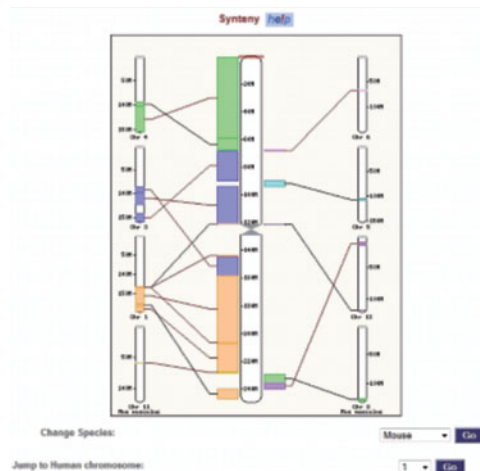



Figura 9.7
Gruppi di sintenia del cromosoma X umano a confronto con il genoma di topo; anche se in posizione diversa, i vari gruppi di geni si trovano tutti sul cromosoma X di topo.

diversi cromosomi di topo. In particolare, i geni del cromosoma 1 umano sono distribuiti nei cromosomi 1, 3, 4, 5, 6, 8, 11 e 13 del topo (fig. 9.6). Estendendo questa analisi agli altri cromosomi, puoi osservare che tutti i cromosomi del topo sono costituiti da un mosaico di segmenti esattamente omologhi a segmenti presenti anche sui cromosomi umani.
Il fatto che interi gruppi di geni mantengano, in specie diverse, la loro posizione relativa (e contengano sequenze altamente conservate) porta a concludere che derivano da un progenitore comune.
Sotto la rappresentazione grafica della sintenia si aprono due tendine che consentono di cambiare, rispettivamente, il cromosoma umano e la specie con cui fare il confronto.

La storia del cromosoma X

Selezionate adesso il cromosoma X. È interessante notare che il cromosoma X umano, a differenza degli autosomi, presenta sintenia solo col cromosoma X del topo (fig. 9.7). Questo è spiegabile in base al fatto che i geni localizzati su questo cromosoma sono espressi in singola copia sia nei maschi (che hanno un solo cromosoma X e quindi un solo allele per ogni suo gene), sia nelle femmine dove, in seguito all'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi X durante lo sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti, una sola copia di ogni gene presente sul cromosoma X (con alcune eccezioni) è funzionante. Per questo motivo, nell'evoluzione, i geni posti sul cromosoma X tendono a rimanere localizzati insieme su questo cromosoma: se si spostassero su un autosoma sarebbe complicato garantire la loro espressione a partire da uno solo dei due alleli (esclusione allelica). Questa sintenia completa (o quasi) si osserva in tutte le specie in cui il sesso è determinato dal maschio eterogametico, cioè nei mammiferi.

Un progenitore comune all'uomo e allo scimpanzé

Lo scimpanzé ha un cromosoma in più rispetto all'*Homo sapiens*. L'esistenza di un cromosoma umano che sia equivalente ai 2 cromosomi dello scimpanzé spiegherebbe questa discrepanza nel numero dei cromosomi delle due specie.
Osserviamo il cromosoma 2 umano e la sua sin-

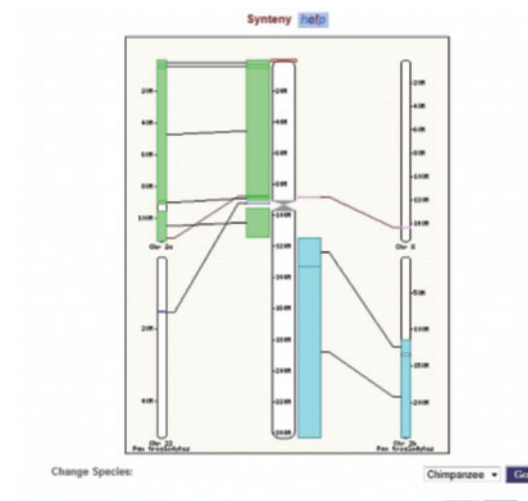



Figura 9.8
Sintenia tra il cromosoma 2 umano e i cromosomi dello scimpanzé.

tenia con lo scimpanzé (fig. 9.8).
La sintenia praticamente completa del cromosoma 2 umano con i cromosomi 2a e 2b dello scimpanzé è una forte evidenza del fatto che questo cromosoma deriva dalla fusione di due cromosomi ancestrali, rimasti separati nello scimpanzé (e anche in altre grandi scimmie, come gorilla e orango). Ulteriore evidenza di questa fusione sta nella posizione delle sequenze telomeriche (specie-specifiche) all'interno del cromosoma 2 umano, che rispetta le attese di un simile evento; inoltre, il centromero del cromosoma 2 umano è allineato al centromero del cromosoma 2a di scimpanzé, mentre resti delle sequenze centromeriche del cromosoma 2b si ritrovano, dove attese, nel cromosoma 2 umano.
Osservando la sintenia tra altri cromosomi umani e di scimpanzé si nota che un gran numero di gruppi sintenici sono localizzati sugli stessi cromosomi; si può concludere quindi che, più le specie risultano vicine evolutivamente, più sono conservati i gruppi di sintenia e questi ultimi sono localizzati sugli stessi cromosomi.

Adesso osserviamo da vicino un cromosoma e vediamo quali informazioni sono disponibili a questo nuovo livello di ingrandimento.
Ritornate alla pagina con il cariogramma umano, quindi selezionate il cromosoma 13. Noterete che il cromosoma 13 contiene un numero di geni relativamente basso. Provate ora a cliccare su una regione del cromosoma e a selezionare *Jump to location View*, magari scegliendo una zona ricca di geni (le aree senza geni sono decisamente meno interessanti!).
Per seguire un percorso comune, dopo aver fatto qualche prova autonomamente, inserite il seguente link :
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32889611-32973347.
Si aprirà una pagina suddivisa in diverse sezioni (fig. 9.9). Nel riquadro 1 "*Chromosome 13*" è in evidenza il punto in cui vi trovate sul cromosoma. Nel riquadro 2 viene mostrata la regione del genoma che avete selezionato (rettangolo rosso); nella parte destra del riquadro 2, sono indicati

Figura 9.9
Riquadro 1
Riquadro 2
Riquadro 3

gli elementi principali che si trovano nel tratto di DNA visualizzato: cloni di DNA utilizzati per effettuare il sequenziamento della regione, marcatori polimorfici, geni ecc..
Il riquadro 3 mostra la struttura del gene presente in questa regione, BRCA2. Si notano dei rettangoli e delle barre collegate da una linea spezzata. Per capire questa rappresentazione grafica è necessaria qualche informazione sull'architettura dei geni. La struttura dei geni eucariotici è peculiare: la sequenza codificante non è continua, ma è frammentata. Nei geni, le parti utilizzate per dirigere la sintesi di proteine o di molecole di RNA sono dette esoni (nella figura rappresentati da rettangoli) e sono alternate ad altre sequenze di DNA, gli introni (linee spezzate). A causa di questa alternanza esoni-introni i geni eucariotici sono definiti "geni interrotti". Esistono alcune rare eccezioni: i geni degli istoni, ad esempio, non sono interrotti.
Cliccando nel riquadro in alto a sinistra su *Alignment* (*text*) si arriva a visualizzare la sequen-

Figura 9.10

Figura 9.11

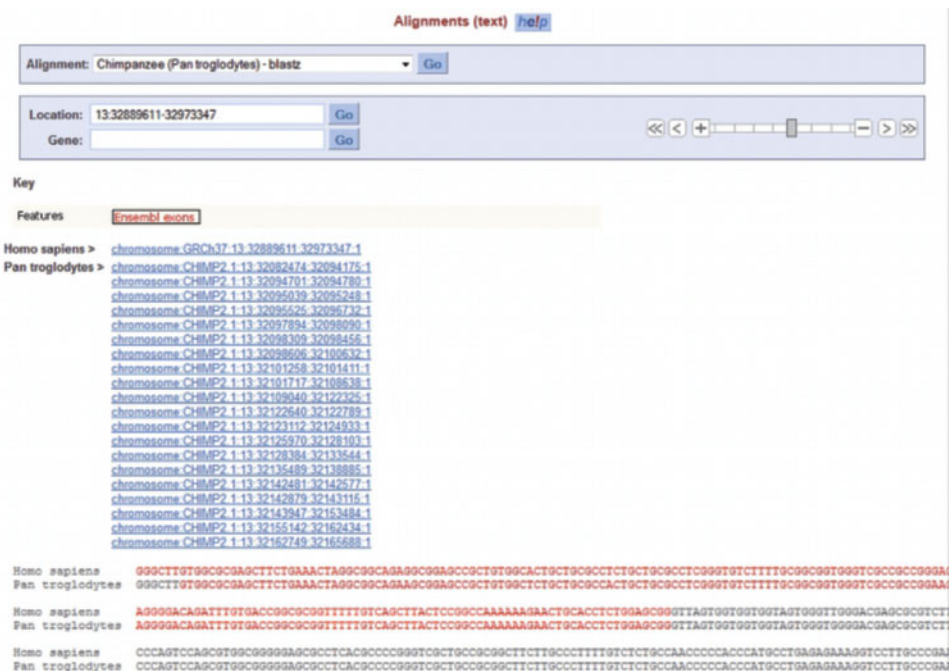



Figura 9.12

za delle basi del gene (fig. 9.10; in rosso le sequenze degli esoni e in nero quelle degli introni).

La sequenza può essere confrontata con quella di altre specie: aprite la tendina nel campo *Alignment* situato sopra alla sequenza di basi del gene BRCA2, selezionate lo scimpanzé e cliccate su *Go*. Compaiono le due sequenze del tratto di DNA di uomo e di scimpanzé, allineate (fig. 9.11). Notiamo che le due sequenze sono pressoché identiche, anche nella scansione esoni-introni. I trattini presenti in alcuni punti sono stati introdotti dal software per ottimizzare l'allineamento delle sequenze.

Tornate a *Region in detail*, cliccando sul menu in azzurro a sinistra della pagina; si possono contare i rettangoli per scoprire quanti esoni contiene il gene BRCA2. Fate click su uno dei rettangoli del gene e scegliete la sigla alla voce *Gene*: si aprirà un nuovo collegamento in cui potrete trovare ulteriori informazioni su questo gene.

Nel riquadro *Gene summary*, cliccando su BRCA2, si aprirà una nuova pagina con molte altre informazioni sul gene in esame; in questa tabella cliccate sulla sigla OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), si aprirà un link alle malattie associate ad alterazioni in questo gene (fig. 9.12).

Il gene BRCA2, insieme al gene BRCA1, rappresenta uno dei principali geni di suscettibilità al cancro della mammella e dell'ovaio. BRCA2 è stato scoperto studiando famiglie islandesi con carcinoma familiare della mammella. Questi due geni sono coinvolti nei meccanismi di riparazione dei danni al DNA, anche se tutte le loro complesse funzioni non sono state ancora completamente chiarite. Solo il 5-10% dei tumori della mammella ha un'origine ereditaria e, in questi casi, nel 90% dei pazienti sono presenti mutazioni in BRCA1 o BRCA2. BRCA1 è coinvolto nel 50-85% dei casi di tumore ereditario della mammella e conferisce un aumento del rischio di tumore all'ovaio del 15-45%. BRCA2 è responsabile del 35% dei casi di tumore ereditario della mammella. Le mutazioni nel gene BRCA2 conferiscono un rischio minore di tumore all'ovaio (10-20%) e sono associate con lo sviluppo di carcinoma della mammella maschile (6%). In entrambi i casi esiste un piccolo aumento del rischio di sviluppare altri tipi di tumore, come ad esempio colon, pancreas e prostata (6-14%). Nei carcinomi non ereditari le mutazioni di BRCA1 e BRCA2 sono invece molto rare. Si stima che, nella popolazione globale, la frequenza di soggetti portatori di mutazioni in uno di questi due geni sia fra 1/500 e 1/1000; a causa dell'"effetto fondatore", nei diversi gruppi etnici singole o poche mutazioni possono diventare predominanti (vedi Per saper-

Per saperne di più

LA DERIVA GENETICA

Uno dei fattori fondamentali dell'evoluzione, oltre alla mutazione e alla selezione naturale, è la **deriva genetica**, ovvero la tendenza fondamentale di ogni allele a variare casualmente in frequenza nel tempo all'interno di una popolazione. Un esempio di deriva genetica è quello del cosiddetto "collo di bottiglia" o "effetto fondatore" (fig. 9.13), in cui una popolazione si ricostituisce a partire da un piccolo numero di individui, per esempio in seguito a un naufragio o un evento geologico, socio-economico o culturale che ha provocato l'isolamento di una piccola parte della popolazione originaria. I pochi individui sopravvissuti non possono rappresentare tutta la variabilità genetica della popolazione originale; i caratteri dei fondatori (sia vantaggiosi che svantaggiosi) si fissano nella nuova popolazione in cui le nuove frequenze alleliche possono ridurre drasticamente la variabilità genetica e fenotipica.
In queste condizioni è facile che aumentino gli incroci non casuali e quindi aumenta la probabilità che i caratteri recessivi vadano in omozigosi, con il conseguente aumento della frequenza di malattie rare.
Esempi di effetto fondatore nell'uomo sono:

- l'alta frequenza di alcuni alleli-malattia nella popolazione di ebrei Askenaziti e negli Amish della Pennsylvania;
- l'assenza quasi totale del gruppo sanguigno B tra gli Indiani d'America (migrati in un piccolissimo numero attraverso lo stretto di Behring, circa 20 000 anni fa);
- l'alta frequnza di albinismo negli Indiani Hopi e Navajos rispetto agli altri.

MALATTIA	SINTOMI
Atassia teleangectasia	Sensibilità alle radiazioni, perdita di equilibrio e di coordinazione, alto rischio di cancro
Sindrome bipolare	Mania-depressione, sbalzi d'umore
Sindrome Ellis van Creveld	Nanismo, polidattilia, anomalie dei denti
Omocistinuria	Alterazioni dei vasi, infarto, ictus

Tabella 9.1
Alcune delle malattie genetiche che mostrano prevalenza nella popolazione Amish della Pennsylvania.

MALATTIA	SINTOMI
Sindrome di Bloom	Sensibilità alle radiazioni, immunodeficenza, aumentato rischio di cancro
Tumore al seno familiare	Carcinoma mammario dovuto a mutazioni del gene BRCA1
Malattia di Gaucher	Ingrossamento della milza e del fegato, danni neurologici
Malattia di Tay Sachs	Degenerione del cervello, ritardo dello sviluppo, paralisi, cecità

Tabella 9.2
Alcune delle malattie genetiche che mostrano prevalenza nella popolazione degli Ebrei.

Figura 9.13
Deriva genetica dovuta all'effetto fondatore o del collo di bottiglia; in seguito a una diminuzione drastica degli individui di una popolazione, diminuisce anche la variabilità genetica. La nuova popolazione sarà genticamente molto diversa da quella originaria.

ne di più La deriva genetica).
Nella tabella precedente si aprono altre pagine che ci portano a scoprire tutte le informazioni note relative al gene in esame, nonché link a banche dati di secondo livello. Prova a cliccare alla voce "*Entrez Gene*". "*Entrez Gene*" è un database di secondo livello da cui si possono trarre molte informazioni. Nel "*summary*" sono descritti la funzione della proteina codificata da BRCA2 (e da BRCA1) nella riparazione dei danni al DNA e il rapporto tra mutazioni in questi geni e la probabilità di sviluppo di cancro alla mammella e all'ovaio.

Adesso che hai imparato a navigare fra i genomi puoi utilizzare questa modalità partendo dal nome di un gene specifico di tuo interesse. Puoi trovare una lista dei geni umani di interesse biomedico al sito: http://www.genecards.org/ e cliccando su "*disease genes*", in fondo alla pagina web, alla voce "*statistics*".
Da quanto sin qui detto, è evidente che per fare *surfing* tra i genomi bisogna conoscere un po' di lingua inglese e questo è vero essenzialmente per tutti gli approfondimenti nell'ambito delle Bioscienze.

Per saperne di più

LE BANCHE DATI

Le **banche dati di primo livello** (banche dati di sequenze nucleotidiche, proteiche, di mutazioni ecc.) catalogano le informazioni provenienti direttamente dalla ricerca in laboratorio. Ogni ricercatore può depositare una sequenza che, dopo essere stata controllata sperimentalmente, viene inserita in banca dati.
Le principali banche dati di sequenze nucleotidiche, sono:

- in Europa, Ensembl (http://www.ensembl.org), gestita da EMBL-EBI;
- negli Stati Uniti, quella gestita dal NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/);
- in Asia, il DDBJ (DNA Data Bank of Japan; http://www.ddbj.nig.ac.jp/).

I gestori delle tre banche dati hanno stipulato un accordo per aggiornare quotidianamente le informazioni e, quindi, il contenuto dei dati di sequenza presenti è quasi del tutto coincidente.
Le **banche dati di secondo livello** raccolgono informazioni dalle banche dati di primo livello per organizzarle in maniera organica e integrata. Se ne ricordano qui due in particolare.

- **OMIM**, Online Mendelian Inheritance in Man: è una banca dati che contiene informazioni sui geni umani e sulle malattie genetiche, realizzata e mantenuta dall'NCBI. Contiene la descrizione di geni e malattie ad essi associate, i quadri clinici e i riferimenti bibliografici, oltre a link a sequenze e ad altre risorse web. Si tratta della versione online del testo "Mendelian Inheritance in Man", ora alla sua dodicesima edizione, a cura di Victor A. McKusick e di un gruppo di colleghi della Johns Hopkins University e di altre istituzioni. La banca dati è aggiornata quotidianamente e riporta solo malattie che sono state associate ad uno o più geni. La pagina di accesso a OMIM si raggiunge tramite un link sulla homepage dell'NCBI: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
- **PubMed:** è una banca dati che permette di ottenere informazioni di tipo bibliografico nel campo della medicina e di altre discipline di tipo biologico e naturalistico. Il database contiene i riferimenti bibliografici a partire dagli anni '50 e viene aggiornato giornalmente. Gli articoli provengono da riviste scientifiche di tutto il mondo. La maggior parte delle voci è in lingua inglese o ha almeno il riassunto in inglese. Per ogni articolo sono disponibili gli *abstract*, le referenze bibliografiche e, in alcuni casi, anche il link per accedere al testo completo (gratuito o a pagamento). Come OMIM, PubMed è a cura del NCBI. Si accede dal sito NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

10. Il codice a barre del DNA

Questa attività vi introduce a un nuovo modo di classificare gli organismi denominato "codice a barre genetico" (DNA barcode): esso si basa sull'analisi di una piccola porzione di DNA mitocondriale, che permette di distinguere le varie specie animali tra di loro.

Attraverso un percorso in internet, vi potrete addentrare, in modo divertente, in un campo di ricerca d'avanguardia, a cavallo fra biodiversità, Bioinformatica e Biologia molecolare, nell'ambito della classificazione degli esseri viventi.

Nuovi metodi di classificazione

Conoscere e classificare la varietà delle forme viventi presenti sul nostro pianeta è un campo di indagine importante nelle scienze della vita. Dal 1730, con Carl von Linné, è iniziata la classificazione tassonomica sistematica degli organismi viventi e, in oltre due secoli e mezzo, gli scienziati sono riusciti a descrivere circa 1,5 milioni di specie; si stima, tuttavia, che questo numero possa raggiungere i 10 milioni. Il "deficit tassonomico" totale (rapporto fra *taxa* attesi e *taxa* identificati) è, quindi, di circa 6. Per quanto riguarda i vertebrati, il numero di specie attualmente descritte è molto vicino al numero "totale" atteso: la maggior parte di questi organismi, relativamente grandi, è ormai stata descritta. Lo stesso si può dire anche per gruppi di organismi più piccoli, con dimensioni fino a 10 mm. La grande maggioranza degli organismi terrestri, tuttavia, ha dimensioni inferiori a 1 mm e per questi gruppi il deficit tassonomico è sicuramente molto superiore a quello dei vertebrati terrestri e delle piante. La medio-micro-fauna e la medio-micro-flora sono la chiave del funzionamento degli ecosistemi e costituiscono la base produttiva per i macro-organismi. Le piccole dimensioni ne rendono difficile l'osservazione visiva e molti degli aspetti morfologici importanti sono addirittura fuori scala rispetto al potere risolutivo di un microscopio ottico.
Dunque il codice a barre del DNA consente di avere accesso a questi animali "invisibili".

Il codice a barre del DNA

La tecnologia necessaria per isolare un gene di interesse e determinarne la sequenza è ormai ampiamente diffusa, relativamente poco costosa e facile da utilizzare (vedi Per saperne di più Il sequenziamento del DNA fig. 10.1 e 10.2). Se riuscissimo a trovare un gene la cui sequenza è significativamente diversa tra le varie specie, tale sequenza costituirebbe un marcatore affidabile per permetterci d'identificare rapidamente le varie specie, partendo da un campione di DNA.
È proprio questa l'idea che sta alla base del **codice a barre del DNA** (così chiamato perché è simile a quello utilizzato per distinguere i prodotti di un catalogo o i prodotti commerciali in un supermercato). L'obiettivo è quello di fornire una

Conoscenze propedeutiche

- Cos'è il DNA
- Il DNA nucleare e il DNA mitocondriale
- La tassonomia linneana
- Il concetto di specie
- L'evoluzione
- La biodiversità

Per saperne di più

IL SEQUENZIAMENTO DEL DNA

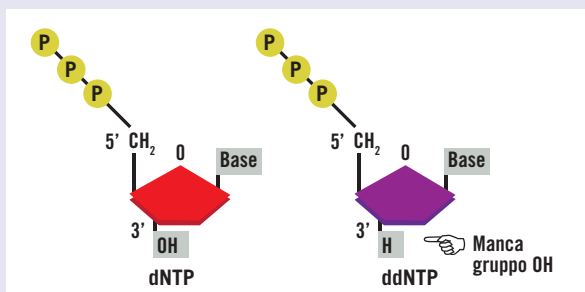



Figura 10.1
A sinistra, struttura di un deossiribonucleoside trifosfato (dNTP) e, a destra, di un deossiribonucleoside trifosfato (senza gruppo ossidrile -OH in posizione 3'.).

Fino ad oggi è stato sequenziato il genoma di molti organismi (incluso l'uomo). Questa importante conquista non sarebbe stata possibile senza lo sviluppo di efficienti metodi di sequenziamento del DNA, potenziati su larga scala dalla possibilità di automatizzare il processo.

Il metodo attualmente utilizzato è derivato da quello messo a punto da Frederick Sanger alla fine degli anni settanta del secolo scorso. Il frammento da sequenziare viene duplicato a partire da un oligonucleotide primer. Nella reazione, oltre ai quattro deossiribonucleosidi trifosfato (dNTP, necessari per sintetizzare nuovi filamenti di DNA), una DNA polimerasi (l'enzima che catalizza il legame tra i dNTP) e l'oligonucleotide primer, si utilizzano anche dei dideossiribonucleosidi trifosfato (ddNTP) come "terminatori" della reazione. Infatti, i ddNTP non possiedono il gruppo ossidrile (OH) in posizione 3' (fig. 10.1), necessario per formare il legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo e far procedere la sintesi della catena di DNA: ciascun tipo di ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) è marcato con un colorante fluorescente diverso. Durante la fase di allungamento, un ddNTP può essere incorporato nella catena di DNA in formazione, alla quale, mancando ora un gruppo OH all'estremità 3', non possono essere aggiunti ulteriori nucleotidi. Ne deriva che la sintesi del DNA si arresta nel punto in cui è stato introdotto un ddNTP. I 4 ddNTP sono incorporati solo occasionalmente e a caso nel filamento di DNA in formazione, in quanto le loro concentrazioni sono più basse di quelle dei dNTP. Alla fine questa miscela di reazione produrrà una serie di molecole di DNA di differenti lunghezze (tante quante i nucleotidi del frammento da sequenziare) e tutte con un'estremità terminale marcata con il colorante fluorescente corrispondente al ddNTP terminale incorporato nella catena di DNA. I frammenti sono separati in base alle loro dimensioni, tramite elettroforesi, in speciali capillari dotati in uscita di una finestra, attraverso la quale passa un raggio laser; un sensore legge e registra il colore del marcatore fluorescente in ciascun frammento, producendo una sequenza di picchi colorati (elettroferogramma), che mostra la sequenza nucleotidica del DNA in esame (fig. 10.2).

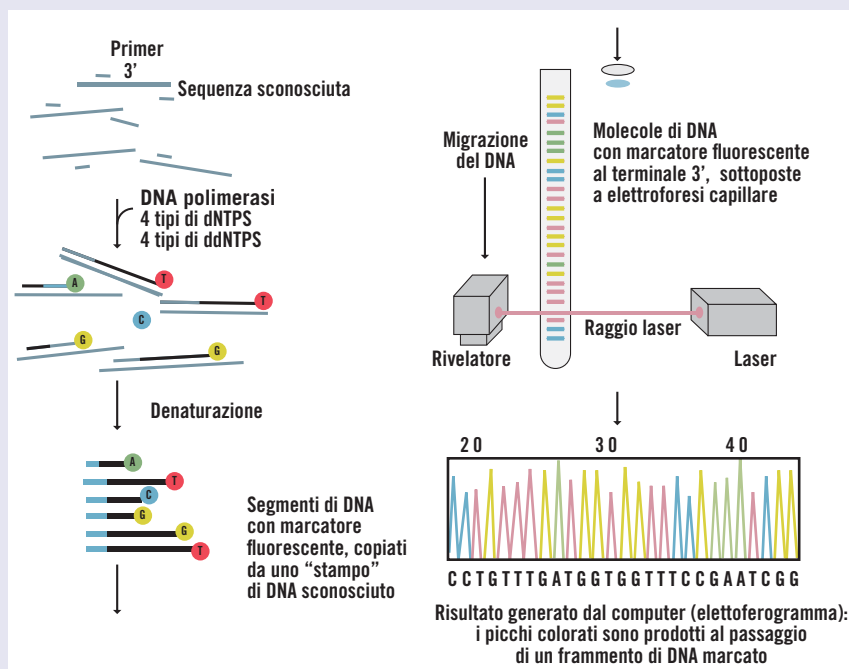



Figura 10.2
Schema riassuntivo delle tappe principali del sequenziamento del DNA.

mappa generale della diversità, di facile accesso per chiunque voglia rapidamente, ma accuratamente, identificare un organismo. Un tale catalogo consentirebbe anche di distinguere nuove specie, non ancora descritte, da quelle già note e potrebbe costituire un valido strumento nel lavoro di conservazione della biodiversità, nella diagnosi di patogeni, nel monitoraggio di specie invasive (quelle in grado di colonizzare nuovi ambienti a scapito delle specie native) e in molti altri campi.

Una sfida tecnologica

Anche se l'idea di base è semplice, lo sviluppo di un metodo affidabile per la determinazione del codice a barre del DNA presenta alcune difficoltà che richiedono di essere affrontate da ricercatori con differenti competenze.

Innanzitutto, è necessario identificare un gene specifico che sia adatto come marcatore per il codice a barre. La sequenza di questo gene deve essere sufficientemente diversa tra specie e specie, in modo che ogni sequenza possa essere univocamente attribuita a un'unica specie di origine. Inoltre, dato che in alcuni casi si osservano variazioni di sequenza anche all'interno di una specie (intra-specie), queste devono essere minori rispetto a quelle tra le specie (inter-specie).
Secondariamente, il metodo attualmente utilizzato per isolare un gene (la PCR, Reazione a Catena della Polimerasi), e quindi per poterne poi determinare la sequenza, richiede che siano note a priori le sequenze fiancheggianti il gene stesso. In pratica, questo gene deve contenere due regioni molto conservate in tutte le specie, mentre il resto della sequenza deve essere molto variabile tra specie e specie.
Tenendo conto di questi due aspetti, i biologi molecolari hanno identificato un gene che sembra possedere le caratteristiche richieste. Si tratta del gene della citocromo ossidasi 1, **CoxI** (fig. 10.3), che codifica per la subunità 1 di un complesso enzimatico coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni nella membrana mitocondriale interna. **CoxI** si trova nel DNA mitocondriale di animali, piante e funghi.

Un'ulteriore difficoltà è rappresentata dalla raccolta dei campioni per il catalogo di riferimento e dal metodo per attribuire correttamente una data sequenza a quella della specie corrispondente presente nel catalogo. I musei scientifici stanno contribuendo a questo scopo mettendo a disposizione le loro collezioni e le loro competenze di tassonomia classica. Sono anche stati stanziati dei fondi per l'isolamento e il sequenziamento del DNA di specie non presenti nelle collezioni museali e per la loro classificazione. Il codice a barre, dunque, ha riacceso l'interesse per gli studi tassonomici.
È evidente che per fornire una banca dati pubblica contenente i dati di sequenza (potenzialmente) di milioni di specie (e gli strumenti necessari per accedere alle informazioni in modo rapido e accurato) è richiesta la stretta collaborazione fra biologi ed informatici.

Lo stato dell'arte

Il Consorzio per il Codice a Barre della Vita (**CBOL**, *Consortium for the Barcoding Of Life*) è un movimento internazionale che comprende musei di storia naturale, erbari, giardini zoologici, istituti di ricerca, agenzie governative e intergovernative, associazioni non governative, compagnie private e altre organizzazioni coinvolte nella

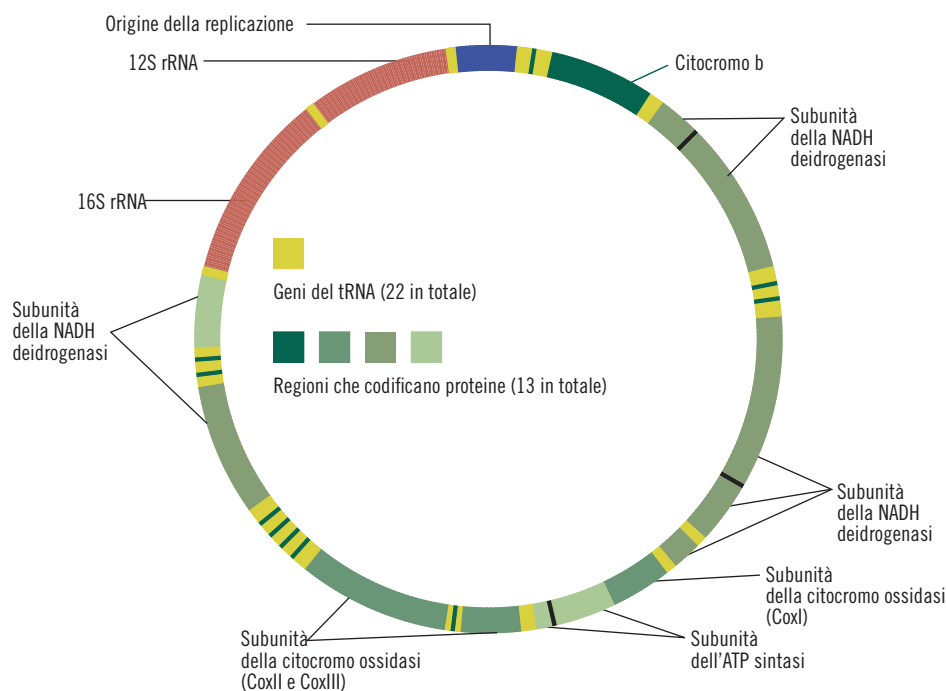



Figura 10.3
Genoma mitocondriale umano. Sono indicati in arancione i 2 geni per rRNA, in verde i 13 geni codificanti proteine, in giallo i 22 geni per tRNA. In evidenza il gene *CoxI*.

Per saperne di più

IL DNA MITOCONDRIALE

I mitocondri contengono un DNA proprio e un loro apparato biosintetico per produrre alcuni degli RNA e delle proteine dell'organello. Questo macchinario di sintesi proteica ricorda quello presente nei batteri: ad esempio, i ribosomi mitocondriali sono sensibili ad antibiotici antibatterici e la sintesi di una proteina inizia con una forma modificata di metionina (la N-formil-metionina). Queste somiglianze sono interpretate come un relitto evolutivo della loro origine: infatti è ampiamente accettato che i mitocondri, come i plastidi, derivino da cellule batteriche inglobate in cellule ancestrali con nucleo (fig. 10.4). Tuttavia, va sottolineato che la maggior parte delle proteine mitocondriali è codificata da geni presenti nel DNA nucleare, i cui trascritti sono tradotti nel citoplasma e poi importati nell'organello.

Figura 10.4
Origine endosimbiotica di mitocondri e plastidi. Un sistema a doppia membrana, come quello che delimita mitocondri e plastidi, può essersi originato in seguito a fagocitosi di una cellula procariotica da parte di una cellula eucariotica.

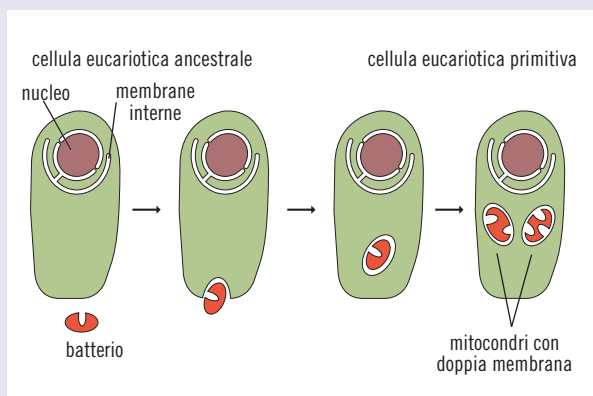
Il DNA mitocondriale è generalmente una molecola circolare, presente in più copie nella matrice del mitocondrio, e può avere dimensioni variabili a seconda dell'organismo, (indicativamente da 6 000 pb (paia di basi), nel plasmodio della malaria, a 300 000 pb in alcune piante terrestri). Nei mammiferi il DNA mitocondriale è di circa 16 500 pb: nell'uomo la sequenza, di 16 569 pb, è stata pubblicata nel 1981 e i suoi geni sono stati mappati (fig. 10.3). Dall'analisi del contenuto di geni nel DNA mitocondriale di diversi organismi sembra che, nel corso dell'evoluzione, ci sia stato un trasferimento di geni dal DNA mitocondriale al DNA nucleare, per cui i genomi mitocondriali più evoluti contengono pochi geni. I geni che codificano i 2 rRNA mitocondriali e quelli che codificano per il citocromo b e per le subunità 1 e 3 della citocromo ossidasi sono comuni a tutti i genomi mitocondriali.
Dall'analisi di sequenze di DNA mitocondriale provenienti da diversi organismi risulta che la frequenza di mutazioni è 10 volte maggiore rispetto al genoma nucleare, probabilmente a causa di un sistema replicativo e/o di riparazione della molecola meno fedele.

ricerca tassonomica e nei temi della biodiversità; coinvolge più di 200 enti in più di 50 paesi nei 6 continenti (fig. 10.5).
La banca dati del CBOL conta oltre un milione di "record" che coprono più di 100 000 specie (dati relativi a giugno 2011); rappresenta solo una piccola parte della biodiversità totale della terra, ma va crescendo di anno in anno (fig. 10.6). È stato costruito anche un sito web (www.barcodinglife.org) e sono stati ideati diversi stru-

Figura 10.5
Il CBOL nel mondo.

menti molto sofisticati per interrogare la banca dati. In essa, per ogni specie, sono catalogate tutte le sequenze di codice a barre disponibili, il luogo e il modo in cui sono stati raccolti i campioni, le connessioni Web ad altri utili link e le relative immagini (fig. 10.7).

Per ora lo sforzo maggiore si è concentrato su alcuni gruppi tassonomici particolari: pesci, insetti e uccelli. Il marcatore *CoxI* sembra funzionare molto bene per tutti i gruppi animali, ma non sono ancora stati identificati marcatori altrettanto specifici per piante e funghi.

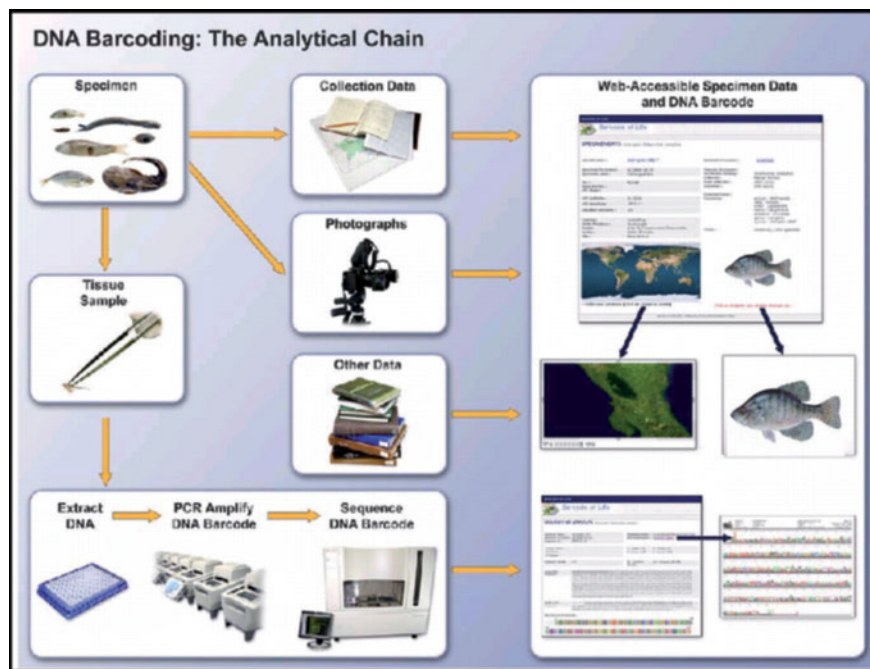



Figura 10.6
Come si costruisce una pagina della banca dati del CBOL.

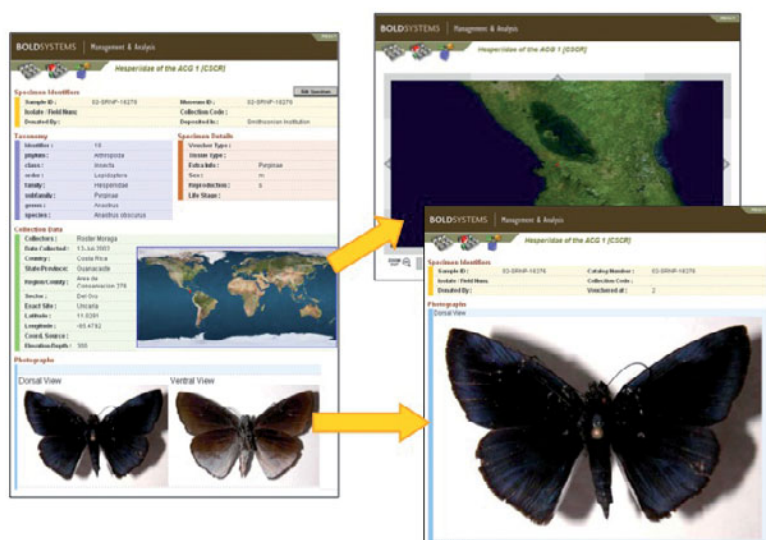



Figura 10.7
Pagine del sito web www.barcodinglife.org.

Identificare le specie

Gli scenari

Abbiamo ricostruito tre scenari per esemplificare alcuni degli ambiti in cui il codice a barre mostra una applicazione pratica, al di fuori della ricerca tassonomica.

1. IN RIVA AL FIUME: identificazione di specie invasive in un determinato ambiente.
2. UN PINO AMMALATO: identificazione di agenti patogeni.
3. È VERO CAVIALE?: riconoscimento di frodi alimentari.
4. WOLPERTINGER: un mistero da svelare.

Per fare gli esercizi, andate alla pagina web: **http://www.cusmibio.unimi.it/documenti/website_new/it/home/index.html**

Figura 10.8

Esercizi

Il primo esercizio, "In riva al fiume", vi consente di identificare le specie che abitano sulle rive di un comune fiume europeo. Leggete attentamente le istruzioni per svolgere l'esercizio fino alla terza videata: usando il mouse cercate nella figura 10.8 gli animali nascosti.
Uno degli organismi che troverete appartiene a una "specie invasiva", cioè non autoctona di questo ambiente e potenzialmente dannosa.

Figura 10.9

Quando scoprite un animale, cliccate e arriverete a una pagina simile a quella riportata in figura 10.9, che contiene l'immagine dell'animale: per trovare il codice a barre dell'organismo selezionare "Clicca qui per vedere il mio *barcode* DNA".

Nella nuova schermata (fig. 10.10) selezionate e copiate tutta la sequenza che appare nella finestra; accedendo al link: **http://barcodinglife.com/views/idrequest.php**, potrete incollarla e scoprire a che organismo appartiene (fig. 10.11). Assicuratevi che sia selezionata la voce "*All Barcode Records on BOLD*". Oltre alla sequenza del DNA barcode, dalla schermata precedente è possibile accedere a un link che fornisce maggiori informazioni sull'organismo.

Nella tabella dei risultati (fig. 10.12) sono elencati i nomi delle specie che hanno codici a barre simili a quello da noi inserito e nell'ultima colonna si trovano le percentuali di somiglianza con la sequenza in oggetto. In generale, valori superiori al 99% indicano che l'identificazione è corretta, mentre quando sono uguali o inferiori al 95% la classificazione non è attendibile.

Adesso potete ritornare alla pagina iniziale e cercare altri animali. Provate ad identificare la specie invasiva e, ricercando in rete, scoprite quale danno può arrecare all'ambiente.

Gli altri esercizi funzionano in modo analogo.
In "È vero caviale" userete le sequenze di codice a barre per discriminare fra il caviale di storione e quello di un economico surrogato.
In "Un pino ammalato" cercherete di identificare la patologia da cui è affetto un pino.
In "Wolpertinger" … Beh, vedete un po' voi!

Figura 10.10

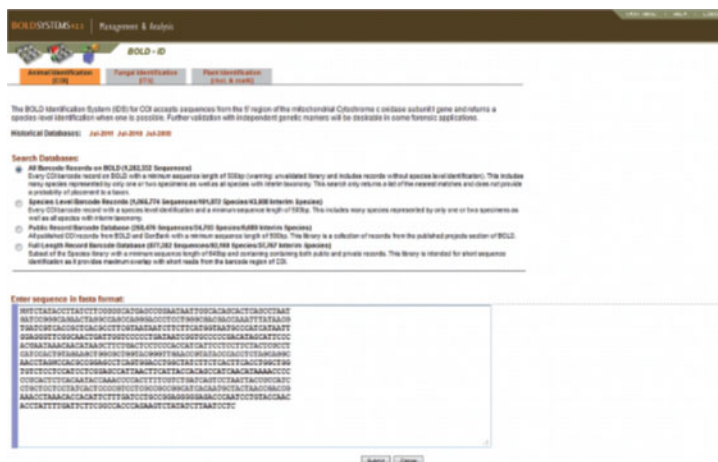



Figura 10.11

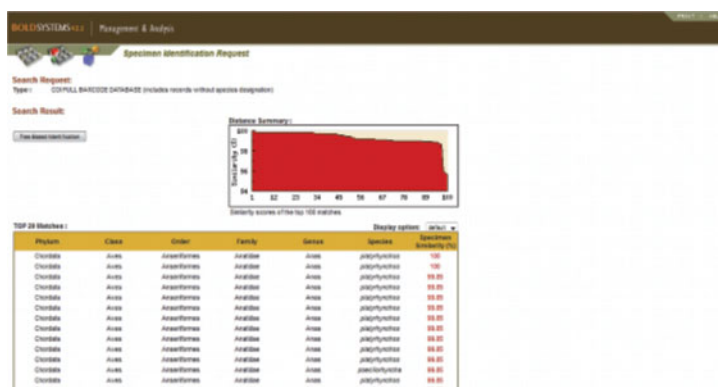



Figura 10.12

11. Le forme invisibili

In questo laboratorio si sperimenterà la tecnica di cristallizzazione delle proteine e, attraverso un percorso in banche dati online, si cercherà di risolvere un misterioso caso di intossicazione alimentare individuando la proteina che l'ha causata.
Il modello strutturale 3D di questa proteina sarà visualizzato al computer con opportuni software.
Operativamente, nella prima parte dell'attività si allestiscono prove di cristallizzazione in diverse condizioni sperimentali e si controlla al microscopio la presenza di cristalli, identificando le condizioni ottimali per la loro formazione.
Nella seconda parte si acquisiscono le basi teoriche e tecnologiche delle procedure che, partendo dall'analisi dei cristalli, consentono di determinare la struttura tridimensionale delle proteine; utilizzando poi un software dedicato, si osserverà la struttura 3D di una proteina cristallizzata.

La medicina del futuro si fa in 3D

Conoscere nei dettagli atomici come è fatta una macromolecola biologica rappresenta un punto chiave per capirne la funzione; le strutture macromolecolari vengono poi raccolte in banche dati specializzate e sono osservabili utilizzando programmi di visualizzazione specifici che consentono di estrarre informazioni funzionali dalla struttura e di confrontare fra loro strutture di macromolecole normali con quelle coinvolte in processi patologici. Questi programmi sono inoltre largamente utilizzati per il disegno razionale dei farmaci e dei vaccini del futuro.

Le due principali tecniche per la determinazione della struttura 3D delle proteine

La diffrazione ai raggi X

È una tecnica non distruttiva utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa dei materiali cristallini, in polvere o allo stato solido. Basandosi sul fatto che qualunque radiazione elettromagnetica è in grado di interagire con la materia, la biocristallografia a raggi X consente di determinare la posizione degli atomi delle molecole che compongono un cristallo, in relazione al modo con cui i raggi vengono deviati dal cristallo stesso. Questa tecnica, quindi, è ottimale per determinare la struttura 3D di macromolecole biologiche a risoluzione atomica (fig. 11.1).
La disponibilità di un cristallo ordinato contenente la proteina è il presupposto indispensabile

Conoscenze propedeutiche

- Struttura delle proteine
- Funzionamento degli enzimi

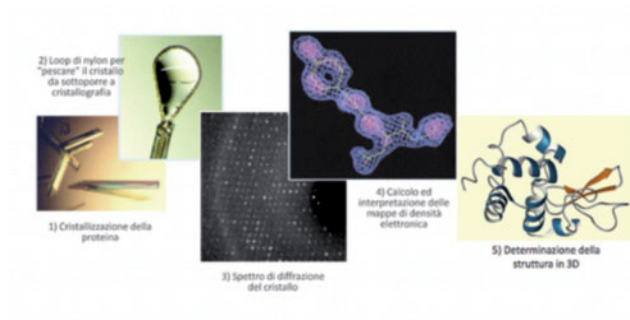
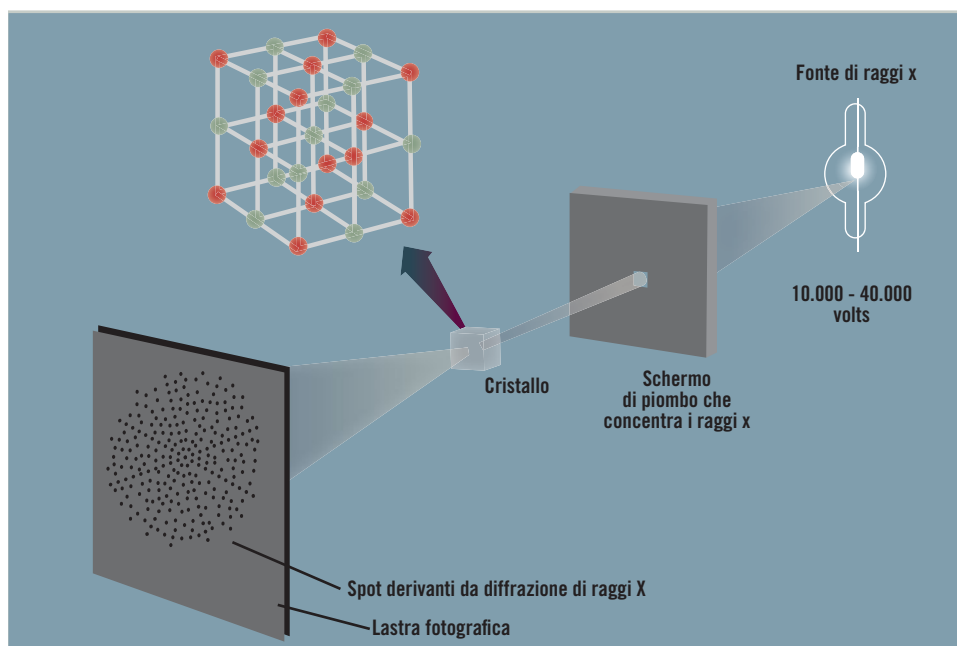
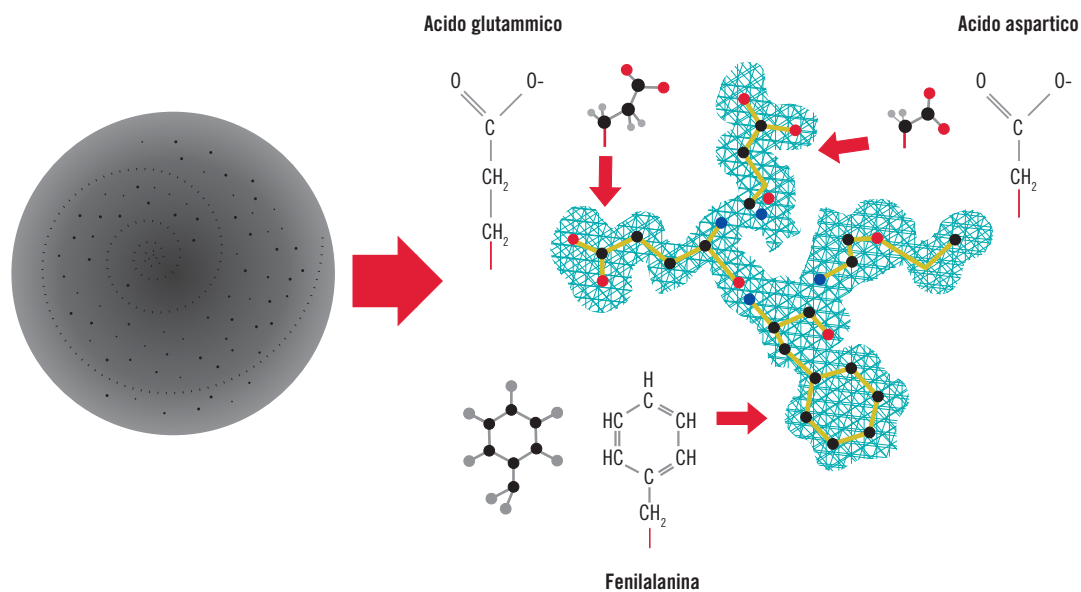



Figura 11.1
Schema dei vari passaggi per ottenere una rappresentazione in 3D di una proteina.

Figura 11.2
Diffrazione ai raggi X. Nei cristalli le molecole sono ordinate in un reticolo. Un fascio di raggi X diretto su un cristallo, incontrando i diversi atomi, viene deviato con angolazioni diverse e, suddiviso in fasci, lascia il cristallo andando a impressionare una lastra fotografica su cui si crea il diffrattogramma.

per procedere alla determinazione della struttura 3D. Non è facile identificare le condizioni ottimali per ottenere cristalli di una determinata proteina che, tra l'altro, deve essere disponibile in forma pura e in quantità adeguate. Le proteine, inoltre, sono molecole irregolari che difficilmente si dispongono ordinatamente. Di conseguenza, spesso, i cristalli e le strutture che noi conosciamo contengono anche molecole del solvente con il quale la molecola è stata cristallizzata. Una volta ottenuto il cristallo lo si posiziona tra la sorgente di raggi X e il rivelatore. Gli atomi del cristallo di proteina deviano i raggi X dal loro percorso e fanno sì che questi, colpendo una lastra fotografica, vi producano una caratteristica figura di diffrazione (diffrattogramma; fig. 11.2), costituita da tante macchie separate, da cui è possibile ricavare una mappa di densità elettronica. Si costruisce, quindi, un modello della struttura della molecola compatibile con le mappe di densità elettronica già note (fig. 11.3). È necessario utilizzare numerosissime immagini per riuscire a ricostruire in modo ottimale una struttura tridimensionale.

La risonanza magnetica nucleare (NMR)

Questa tecnica è utilizzabile per determinare la

Figura 11.3
La distribuzione della densità elettronica nel cristallo può essere interpretata dal cristallografo che ricostruisce la catena aminoacidica ad essa corrispondente.

struttura 3D di proteine relativamente piccole, contenenti fino a 250-300 aminoacidi. Una soluzione concentrata di proteina viene posta in un campo magnetico: i nuclei di determinati elementi tendono ad allinearsi col campo magnetico esterno, proprio come l'ago di una bussola. Si misurano a questo punto gli effetti sui nuclei sollecitati da diverse radio-frequenze: i vari nuclei nella proteina assorbono l'energia elettromagnetica (risonanza) a frequenze differenti in base al loro ambiente elettromagnetico locale, connesso alla struttura 3D della proteina. Quando cessa la sollecitazione degli impulsi a radiofrequenza che perturbano i nuclei, questi ultimi tornano al loro stato energetico originale emettendo radiazioni. Ai nuclei sono associati valori di risonanza e in base a come rispondono alle perturbazioni si deducono le distanze internucleari. Queste distanze sono poi utilizzate per generare un modello della struttura 3D della proteina(fig. 11.4). Poiché tali distanze internucleari sono imprecise, molti modelli simili possono risultare compatibili con le osservazioni sperimentali misurate; così le strutture NMR sono rappresentate come un insieme di diverse strutture 3D simili sovrapposte fra loro. Questa tecnica ha il vantaggio di non richiedere la cristallizzazione della proteina. Inoltre la NMR può misurare alcune proprietà dinamiche delle proteine, su una scala di tempi piuttosto estesa.

Le due tecniche sono complementari. Quando è possibile preparare cristalli sufficientemente ordinati, la diffrazione ai raggi X è la tecnica migliore per ottenere informazioni sulla struttura tridimensionale delle macromolecole e dei loro complessi con leganti e/o con altre macromolecole.
La NMR è la tecnica d'elezione per lo studio delle strutture biologiche in soluzione, ma le dimensioni delle macromolecole che possono essere analizzate sono attualmente limitate.

PERCHÉ I RAGGI X?

La lunghezza d'onda dei raggi X è di circa 1 Å, che è **dell'ordine di grandezza delle distanze interatomiche** e permette quindi di identificare la posizione dei singoli atomi.

PERCHÉ I CRISTALLI?

Per **amplificare il segnale** di diffrazione (un cristallo è formato da 10^{15}-10^{16} molecole identiche).

Figura 11.4
Apparecchiatura per NMR e struttura 3D di una proteina.

La cristallizzazione di una proteina

In questa esperienza di laboratorio si osserveranno le diverse condizioni per la cristallizzazione di una proteina e, successivamente, si analizzerà al computer la struttura della proteina in esame.

La proteina che viene cristallizzata è il **lisozima**, un enzima con azione battericida in grado di distruggere il peptidoglicano delle pareti cellulari dei batteri. Il peptidoglicano è una catena polisaccaridica complessa, composta da due tipi di zuccheri (N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), quest'ultimo contenente anche un corto peptide di pentaglicina) che si alternano formando una catena. La struttura a lamina rigida della parete batterica è conferita da legami che si instaurano fra le parti polipeptidiche di due catene adiacenti (fig. 11.5). Il lisozima svolge la sua azione battericida scindendo il legame glicosidico fra due zuccheri adiacenti. Nell'uomo questa proteina è prodotta dai macrofagi e dai granulociti ed è particolarmente abbondante nelle secrezioni, quali lacrime, muco e saliva.

Scaricate le schede del protocollo per l'allestimento della prova di cristallizzazione del lisozima del pollo (proteina di 129 aminoacidi, estratta da albume di uovo di gallina) secondo il metodo della diffusione di vapore. Sono utilizzate due diverse condizioni sperimentali per identificare le condizioni ottimali di cristallizzazione.

Dall'analisi dei cristalli alla costruzione della struttura 3D della proteina

Il periodo intercorrente fra la preparazione delle prove di cristallizzazione e l'analisi al microscopio dei cristalli (almeno due ore) può essere utilizzato per esaminare la serie dei passaggi operativi necessari per ottenere un modello in 3D di una proteina a partire da un cristallo, come illustrato nella figura 1.1.

La procedura si articola in 3 fasi:

Fase 1

Raccolta dei dati di diffrazione derivanti dall'interazione dei raggi X con le molecole proteiche contenute nel cristallo.

Fase 2

Questi dati sono una misura della "densità elettronica", di come gli elettroni, e cioè gli atomi, sono distribuiti nello spazio del cristallo. Le proteine più piccole hanno anche più di 1 000 atomi; le più grandi possono avere 10 000-100 000 atomi.

Fase 3

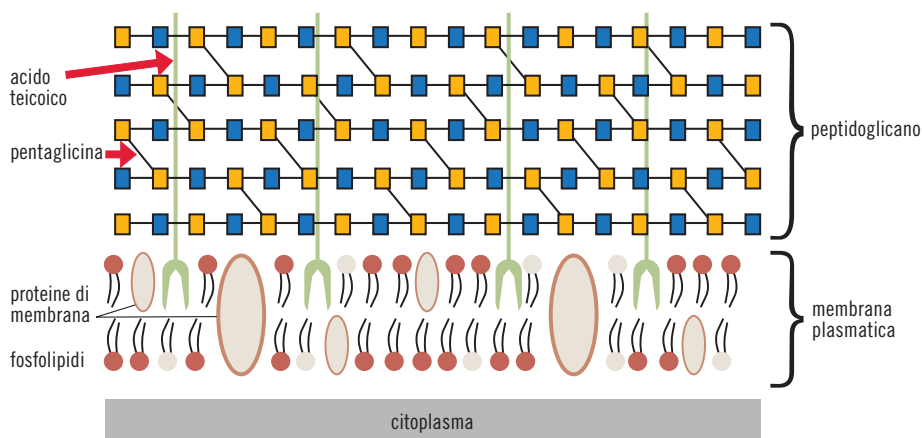
Dalla visualizzazione della densità elettronica della proteina si può ricostruire il modello molecolare.

Quali sono le applicazioni maggiori della biocristallografia?

Conoscere la struttura 3D di una macromolecola biologica consente di capire come avvengono i processi biologici a livello atomico e quindi come la macromolecola svolge la sua funzione.

Inoltre è possibile:

- studiare l'interazione fra macromolecole;
- studiare le interazioni fra macromolecole e piccole molecole (acqua, ligandi, ioni, cofattori, inibitori …);
- comprendere la relazione fra struttura e fun-

Figura 11.5
Struttura della parete batterica. I quadratini indicano gli zuccheri del peptidoglicano: in blu la N-acetilglucosamina (NAG) e in arancione l'acido N-acetilmuramico (NAM). I due tipi di monomeri sono connessi da legami glucosidici, mentre corti peptidi di pentaglicina uniscono due monomeri NAM di catene adiacenti, formando così una complessa struttura a rete. La parete è ancorata alla membrana plasmatica attraverso molecole di acido teicoico.

zione di una data proteina;
- progettare razionalmente nuovi farmaci.

Detective degli alimenti: una pista bianco shocking

Nello scenario proposto, l'indagine molecolare si rivela fondamentale nell'individuazione e nell'analisi di sostanze tossiche che possono aver causato danni alla salute.
Una giovane donna viene ricoverata d'urgenza al pronto soccorso con i sintomi di uno shock anafilattico, probabilmente dovuto ad allergia alimentare. È accompagnata da un amico avvocato con cui era a cena in un ristorante quando ha accusato i primi sintomi. Sapendo di essere allergica alle proteine dell'uovo e alla soia, ha scelto un menu (fig. 11.6) che escludesse queste sostanze. L'amico avvocato è pronto a intentare causa al ristorante per frode alimentare.

Seguendo le istruzioni, scaricate da internet le tre sequenze aminoacidiche appartenenti a proteine isolate dai cibi consumati dalla donna. Dovrete risalire alle proteine a cui appartengono e identificare quale può essere responsabile della violenta reazione allergica accusata dalla donna. Le sequenze sono indicate utilizzando il codice di aminoacidi a una lettera (Tab. 11.1).

Figura 11.6

>Proteina 1
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL
RLAKEYEATL EECCAKDDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCDQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS

>Proteina 2
DQAMEDIKQM EAESISSSEE IVPNSVEQKH IQKEDVPSER YLGYLEQLLR LKKYKVPQLE IVPNSAEERL
HSMKEGIHAQ QKEPMIGVNQ ELAYFYPELF RQFYQLDAYP SGAWYYVPLG TQYTDAPSFS DIPNPIGSEN SEKTTMPLW

>Proteina 3
KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSS

first position	second position: U		C		A		G		third position
U	UUU	Phe/F	UCU	Ser/S	UAU	Tyr/Y	UGU	Cys/C	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu/L	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP	A
	UUG		UCG		UAG	STOP	UGG	Trp/W	G
C	CUU	Leu/L	CCU	Pro/P	CAU	His/H	CGU	Arg/R	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln/Q	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	CUU	Ile/I	ACU	Thr/T	AAU	Asn/N	AGU	Ser/S	U
	CUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys/K	AGA	Arg/R	A
	AUG	Met/M	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val/V	GCU	Ala/A	GAU	Asp/D	GGU	Gyl/G	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu/E	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Tabella 11.1
Schema del codice degli aminoacidi a 3 e a 1 lettera.

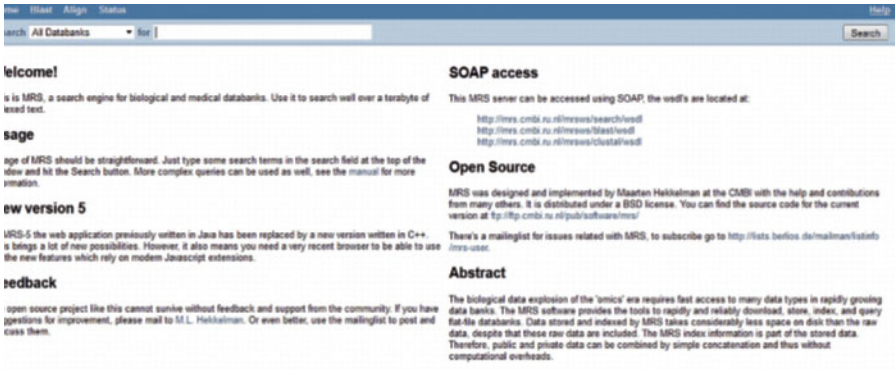
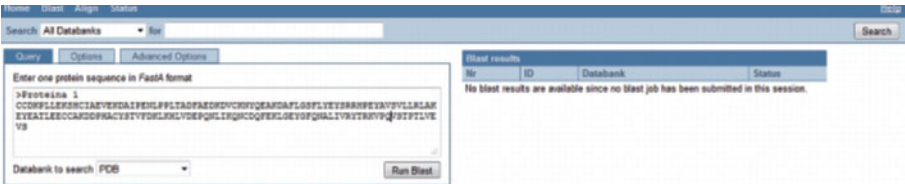



Figura 11.7

Figura 11.8

Per ricercare a quale proteina appartengono le tre sequenze, andate su http://mrs.cmbi.ru.nl/mrs-5/, la "home page" di MRS, un motore per effettuare ricerche nelle principali banche dati biologiche online (fig. 11.7).

- Cliccate sul link **Blast**, posto sulla barra azzurra in cima alla pagina.
- Nel riquadro bianco che compare al centro della nuova pagina incollate la sequenza amminoacidica della proteina 1. La prima riga della sequenza cercata deve sempre cominciare con il simbolo > seguito dal nome della proteina per essere conforme con "FASTA", il formato di testo standard per la ricerca nelle banche dati biologiche on-line (fig. 11.8).
- Verificate che sia selezionata l'opzione *Uniprot KB* nel campo *Databank to search*
- Cliccate a questo punto su ***Run Blast***. Nella tabella "Blast results", selezionate la riga con i risultati per la proteina cercata.

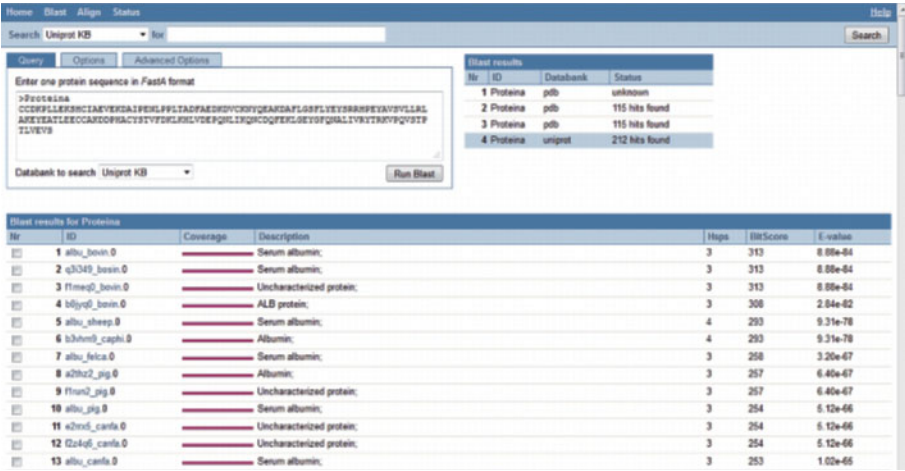
Compare una tabella articolata in diversi campi (fig. 11.9).

Blast ha individuato molte proteine con una sequenza aminoacidica simile a quella da voi ricercata. La sequenza che ci interessa deve avere il punteggio (BitScore) più alto e un valore di E-value molto basso (questo significa che il risultato della ricerca è molto attendibile).

In prima posizione il software riporta sempre la proteina che mostra il più alto grado di somiglianza con la sequenza *query*, appartenente alla proteina in esame. Nel nostro caso il primo risultato consiste nella albu_bovin, cioè l'albumina presente nel siero del bue.

Osservate la lista. Per ciascuna proteina riconosciuta da Blast come simile a quella di partenza vengono riportati:

- nella colonna ID il codice che identifica nella banca dati la sequenza della proteina: esso è costituito dal nome della proteina seguito dal nome abbreviato dell'organismo di provenienza, che nel nostro caso, per il primo risutato, è quello del bue;
- nella colonna Coverage indicazioni relative al livello di corrispondenza tra la sequenza della proteina da voi cercata e quella omologa trovata dal software. In particolare, una linea colorata rossa indica che la sequenze proteina1 è completamente sovrapponibile alla albu_bovin. Le linee blu e azzurre degli altri hits della lista indicano sovrapposizioni parziali;
- nella colonna *Description* una breve descrizione della sequenza rintracciata da Blast;

Figura 11.9

- nelle colonne Hsps, Bitscore e E-value, dei valori calcolati da Blast che indicano il grad di affidabilità dei risultati della ricerca.

Cliccate sulla sigla della proteina albu_bovin. Si aprirà una pagina (fig. 11.10) con diverse informazioni utili a identificare la proteina, a scoprire la sua funzione e i suoi effetti sulla salute umana.

Servitevi delle informazioni contenute nelle sezioni "Entry information" e, in particolare all'interno dei campi *Name and origin*, Comments, Features key and Sequence information per rispondere alle domande relative alla proteina albu_bovin.

Ritornate alla lista delle proteine trovate da Blast. Cliccate sulla linea rossa corrispondente alla albu_bovin. Troverete che i 150 aa della vostra query corrispondono perfettamente (100% Identity) ad altrettanti aa della albumina bovina; cliccando nuovamente sulla linea rossa, compare una sezione in cui viene mostrato l'allineamento tra la proteina1 e albu_bovin (fig. 11.11).

La sequenza della prima proteina da voi inserita è identificata dalla lettera Q, che sta per query. Quella della proteina albu_bovin è contrassegnata invece dalla lettera S.
Le lettere che identificano gli aminoacidi identici tra Q e S vengono riportate nella riga posta tra le due sequenze.
Notate che i 150 aa della sequenza query corrispondono agli aa 301-450 della albumina bovina.

1. Di quale proteina si tratta?
2. Da quale organismo proviene?
3. Qual è la sua funzione?
4. Qual è la sua lunghezza in aminoacidi?
5. È presente nel cibo ingerito dalla donna?
6. Può essere la responsabile della reazione allergica della donna? Argomentate la vostra risposta.

A questo punto, per identificare le proteine a cui appartengono le altre due sequenze, ripetete tutti i passaggi della ricerca con Blast all'indirizzo web http://mrs.cmbi.ru.nl/mrs-5/blast. Analizzate le

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
È un software per il confronto multiplo tra sequenze nucleotidiche e amminoacidiche. Consente di identificare una determinata sequenza appartenente a un gene o a una proteina ignoti, confrontandola con altre sequenze archiviate nei principali database biologici e calcolandone il grado di similarità con ciascuna di queste. È uno strumento utile per ricostruire le relazioni funzionali ed evolutive tra sequenze diverse e identificare membri di una stessa famiglie genica o proteica.

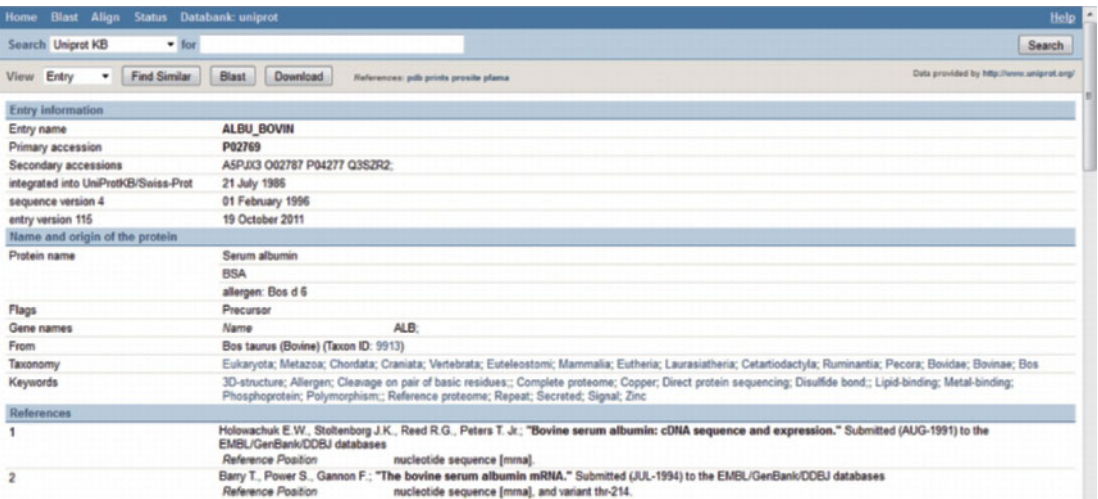



Figura 11.10

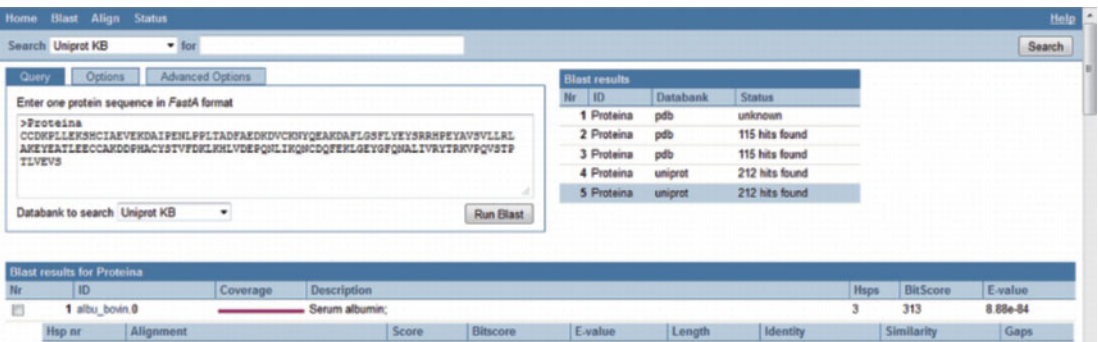



Figura 11.11

informazioni ottenute e rispondete per ciascuna molecola alle sei domande precedenti.
Traete infine le vostre conclusioni sul caso della donna allergica.

Tra le tre proteine, l'unica a cui la donna ha dichiarato di essere allergica è il lisozima del pollo, contenuto in grande quantità nell'albume dell'uovo. Ma in quale dei cibi ingeriti può essere contenuto il lisozima di pollo?

Il mistero si risolve!

Il lisozima ottenuto dall'albume dell'uovo viene utilizzato nella produzione dei formaggi per la sua azione litica sulla parete dei batteri, in particolare quelli responsabili del gonfiore tardivo dei formaggi a lunga stagionatura come grana, provolone, asiago.
Da quando il lisozima di pollo è stato autorizzato nella tecnologia casearia, la determinazione della presenza di queste proteine è diventata obbligatoria per controllare la conformità dei formaggi alle leggi che ne disciplinano la produzione e l'etichettatura e per verificare l'autenticità di prodotti per i quali l'uso del lisozima non è consentito, come il Parmigiano-Reggiano.

Evidentemente il Parmigiano utilizzato dal Ristorante, contrariamente a quanto dichiarato sul Menu, non è Reggiano (il grana Padano può contenere lisozima in quantità non superiore a 300 mg/kg). La donna quindi ha buone probabilità di vincere la causa per frode alimentare.

Figura 11.12
Visualizzazione di un corto peptide con la rappresentazione a "ball and stick", ossia sfere e bastoncini.

YASARA
È un programma di grafica molecolare, di modeling e di simulazione per Windows, Macintosh e Unix, utile per visualizzare e manipolare i modelli delle proteine. È stato sviluppato da Elmar Krieger, al CMBI (Centre for Molecular and Biomolecular Informatics) in Olanda. Consente, tra le altre cose, di creare immagini da inserire nei lavori scientifici. Ha un'interfaccia intuitiva e una grafica fotorealistica. Di facile utilizzo, garantisce una buona interazione con la realtà virtuale. Per utilizzare questo programma bisogna installarlo scaricandolo dal sito www.yasara.org. Il download è gratuito previa registrazione.

Una proteina in 3D

In questa parte dell'attività analizzerete la struttura tridimensionale della sostanza che ha causato la reazione allergica, imparerete ad interpretare la ricostruzione grafica al computer di questa molecola e a rintracciarne gli elementi funzionali più importanti.

Primi passi con il software YASARA

- Installate il software YASARA e avviatelo.
- Cliccate sul pulsante File, posto nella barra degli strumenti e poi selezionate Load, YASARA Scene.
- Selezionate il file introduction.sce e confermate con OK. Vi appare la struttura del peptide con la sequenza Asp-His-Arg-Gly-Gly-Met-Lys-Tyr (codice a tre lettere degli aa) nella rappresentazione detta a "ball and stick" (fig. 11.12). In questa modalità di visualizzazione i singoli atomi sono rappresentati da pallini, connessi fra loro da bastoncini che raffigurano i legami chimici. Non sono rappresentati gli atomi di idrogeno.
- Osservate il modello: noterete che il peptide è avvolto in una nuvola che rappresenta la superficie di Van der Waals. Questa superficie mostra lo spazio effettivamente occupato dagli atomi.
- Muovete il mouse lungo la parte inferiore dello schermo di YASARA: comparirà la barra con la sequenza. Per mantenerla visibile cliccate sul pulsante blu posto all'estremità sinistra della barra.

- Cliccate ora sui singoli amminoacidi: il programma metterà in evidenza il carbonio alfa. Premendo il tasto Ctrl mentre cliccate su un amminoacido la proteina ruota e si ingrandisce in modo da mostrare distintamente l'atomo. Tenendo premuto il tasto del mouse e muovendolo sull'immagine potete spostare la proteina.
- Cliccate ora il pulsante sinistro del mouse. Così farete ruotare la proteina; il pulsante centrale del mouse la sposta; il pulsante destro attiva lo zoom.
- Cliccate a questo punto sui diversi atomi, che sono contrassegnati da YASARA mediante l'uso di uno specifico codice colore: nella parte sinistra della finestra compariranno informazioni su ciascuno di questi.

Quali sono gli atomi presenti nel peptide ?
Qual è il codice colore utilizzato nel programma YASARA per i diversi atomi?
Rosso = ...
Blu = ...
Verde = ...
Azzurro = ...

Soffermatevi ora sui bastoncini corti gialli e bianchi che collegano gli atomi: rappresentano i legami covalenti, in giallo i doppi legami e in bianco i legami singoli.

Ora spostate la vostra attenzione sui bastoncini colorati in verde, blu e arancione che compaiono nella rappresentazione: essi raffigurano tre tipi di legami deboli tra atomi che sono importanti per l'assunzione della struttura terziaria della proteina e, rispettivamente, legami idrogeno, interazioni ioniche (ponti salini), interazioni idrofobiche.

La struttura 3D del lisozima

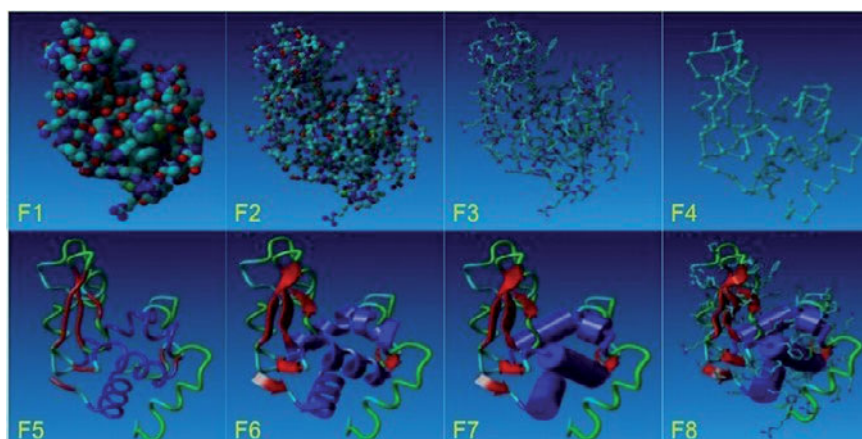
Ora analizzerete la struttura 3D del lisozima.

- Cliccate sempre sul comando *File* posto nella barra dei menu e poi su *New*: si aprirà una scheda in cui vi si chiede conferma della scelta di abbandonare la precedente sessione.
- Confermate con *Yes*.
- Cliccate come in precedenza su *File*, *Load*, *PDB file* e a questo punto selezionate *3IJV.pdb* (per scaricare il file con l'estensione .pdb andate sul link: **http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do** e scrivete nel campo vuoto davanti a search la sigla 3IJV e cliccate *Search*. Si aprirà una pagina dedicata al lisozima di pollo e potete fare il download del file .pdf visualizzabile con YASARA).

Apparirà la molecola del lisozima nella rappresentazione a pallini: qui vengono mostrati solo gli atomi della proteina, identificati da piccole sfere. Per osservare altri elementi presenti nella molecola potete visualizzare ricostruzioni grafiche alternative della proteina premendo sulla tastiera i pulsanti da F1 a F8 (fig. 11.13). In particolare cliccando sul tasto:

- F2: visualizzerete la rappresentazione a pallini e bastoncini. Qui oltre ai singoli atomi, sempre raffigurati mediante pallini, appaiono anche i legami sotto forma di bastoncini;
- F3: visualizzerete la rappresentazione a bastoncini. In questo caso gli atomi sono mostrati come dei segmenti;
- F4: visualizzerete traccia degli atomi di Carbonio alfa collegati attraverso dei bastoncini;
- F5: visualizzerete la traccia dell'ossatura della proteina senza le catene laterali;
- F6: visualizzerete gli elementi della struttura secondaria in una rappresentazione a *cartoon*;
- F7: visualizzerete sempre la struttura secondaria in una rappresentazione a cartoon alternativa;
- F8: aggiungerete o rimuoverete le catene laterali degli aminoacidi (gruppi "R") nelle rappresentazioni a bastoncini e a pallini e bastoncini;
- F1: visualizzerete nuovamente la rappresentazione a pallini.

Navigate nelle rappresentazioni che mettono in evidenza gli elementi della struttura secondaria, cliccando sui pulsanti F5, F6 e F7 e rispondete alle domande successive.
Qual è la struttura secondaria delle regioni rosse della proteina? E di quelle blu?
Trovate poi i seguenti cinque elementi o strutture,

Figura 11.13
Varie rappresentazioni grafiche della proteina ottenuta premendo i tasti da F1 a F8.

Storia della scienza

IL PRIMO CRISTALLO DI UNA PROTEINA

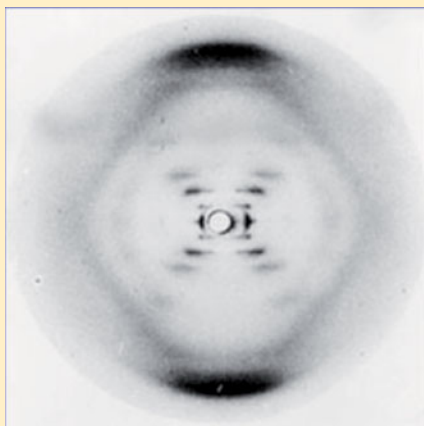



Figura 11.14
Foto 51, a sinistra, e Rosalind Franklin, a destra.

Solamente alla fine degli anni cinquanta del secolo scorso è stato possibile cristallizzare e studiare, mediante diffrazione ai raggi X, la struttura a livello atomico della prima proteina, la **mioglobina**. Questa struttura venne risolta da Max Perutz e Sir John Kendrew, che ottennero nel 1962 il Premio Nobel per la chimica.

La foto 51: si può fare la cristallografia anche degli acidi nucleici
Il contributo sostanziale di Rosalind Franklin alla determinazione della struttura del DNA sta nell'aver prodotto diffrattogrammi di fibre di DNA purificate. Nel laboratorio di Maurice Wilkins al King's College di Londra riuscì per prima a ottenere immagini riproducibili e analizzabili del DNA nella forma B, la più fisiologica. La famosa foto 51 (fig. 11.14) che Wilkins, all'inizio del 1953, mostrò a Watson all'insaputa della Franklin, fu fondamentale per la definizione del modello della doppia elica del DNA.
Crick e Watson si erano incontrati nel laboratorio di cristallografia di Max Perutz a Cambridge nel 1951 e avevano iniziato a collaborare in un progetto per determinare la struttura del DNA. Basandosi sui dati sperimentali a disposizione all'epoca, avevano tentato di costruirne i primi modelli strutturali. Watson, appena vide la foto 51, intuì immediatamente che quella immagine conteneva la soluzione del problema! La ridisegnò tornando a casa e la mostrò subito a Crick: il modello della doppia elica del DNA fu pubblicato su *Nature* il 25 aprile del 1953.

Struttura cristallografica di un organello
Il problema della definizione della struttura dettagliata a livello atomico di un organello mediante diffrazione dei raggi X su cristallo era senz'altro una sfida molto difficile.
La cristallizzazione del primo complesso multimolecolare, il ribosoma, ha richiesto circa trent'anni e ha valso nel 2009 il premio Nobel per la Chimica a Venkatraman Ramakrishnan (UK), del Laboratorio di Biologia molecolare di Cambridge (UK), a Thomas A. Steitz, dell'università di Yale (USA) e a Ada E. Yonath, del Weizmann Institute of Science di Rehovot (Israele).
Le prime osservazioni effettuate lasciavano pensare che cristallizzare i ribosomi, o almeno cristallizzare indipendentemente le due subunità di cui sono composti, non fosse fantascienza. Nel 2000 Steitz pubblicò la struttura della subunità maggiore del ribosoma, mentre Yonath e Ramakrishnan, indipendentemente, hanno definito la struttura della subunità minore (fig. 11.15).

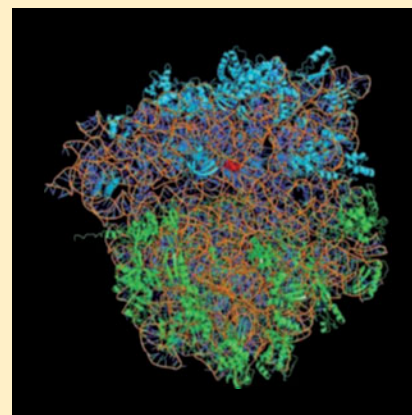



Fig. 11.15
Struttura cristallografica di un ribosoma batterico; le molecole di rRNA sono visualizzate in arancione, le proteine della subunità minore in blu e della subunità maggiore in verde.

utilizzando per ciascun elemento la rappresentazione appropriata: un atomo di Ossigeno con un doppio legame; un legame peptidico; la catena laterale di un'istidina; un'alfa elica; un ponte disolfuro.

Adesso provate a trovare il sito attivo della proteina, e cioè il sito in cui avviene effettivamente la reazione catalizzata dall'enzima. Tipicamente esso si trova nella tasca o nella cavità più ampia presente sulla superficie della proteina.
Cercate il sito attivo del lisozima facendo ruotare il modello 3D della proteina e avvicinandolo con lo zoom. Scegliete la rappresentazione che ritenete più appropriata (da F1 a F8) e avviate la ricerca.
Nel sito attivo del lisozima sono stati individuati due residui critici nell'attività catalitica dell'enzima: sono due aminoacidi bicarbossilici in posizione 35 (Glu, acido glutammico) e in posizione 52 (Asp, acido aspartico), i cui gruppi –COOH sono essenziali per l'idrolisi del legame glicosidico che unisce i residui NAM e NAG adiacenti nella catena del peptidoglicano. Per individuarli cliccate il pulsante blu nella parte inferiore della rappresentazione e scorrete con la barra fino a trovare gli aminoacidi nelle posizioni indicate.

12. I nostri geni su un microchip

Questa attività prevede la simulazione di un esperimento di microarray, una delle recenti applicazioni delle nanotecnologie alla Biomedicina, che consente di analizzare contemporaneamente l'espressione di tutti i nostri geni, ad esempio in un determinato tessuto o in un particolare tipo cellulare, in maniera rapida ed efficace!

Microscopici biochip e analisi informatiche di stupefacente potenza, impossibili da realizzare in un laboratorio didattico, saranno sostituiti da strumenti di uso quotidiano per simulare lo studio dell'espressione di alcuni geni in particolari condizioni (per esempio nello stesso tessuto in condizioni normali e patologiche).

I microarray a DNA: una nuova tecnologia per studiare l'espressione dei geni

Salvo pochissime eccezioni, le cellule dell'organismo contengono tutte un corredo cromosomico completo e gli stessi geni. Nelle diverse cellule, però, è espressa solo una sottopopolazione di tutti i possibili geni e questo conferisce a ciascun tipo cellulare le sue caratteristiche di unicità.

L'espressione genica è un processo sottoposto a una regolazione molto sofisticata al fine di garantire una risposta dinamica al variare degli stimoli extra e intracellulari. Questo meccanismo di regolazione è dotato di **interruttori ON/OFF** che consentono l'accensione o lo spegnimento di specifici geni, ma anche il controllo del loro "volume", cioè del livello della loro espressione.

Per capire come una cellula risponde alle continue modificazioni ambientali è molto importante studiare quali e quanti mRNA vengono prodotti: cioè quali geni sono espressi (e quanto) in una determinata condizione.

Si noti che l'espressione genica non si limita alla sintesi di mRNA dai geni che codificano per proteine, ma comprende anche la trascrizione di geni che codificano per RNA funzionali, come gli RNA ribosomali, RNA transfer o altri piccoli RNA, come i miRNA (micro RNA) recentemente identificati, la cui funzione sta assumendo una crescente importanza.

La tecnologia dei microarray facilita l'identificazione, la classificazione e l'attribuzione della funzione dei geni. Utilizzando particolari supporti solidi (nel caso più semplice un vetrino) a cui sono legate, secondo uno schema predefinito (*array*), sequenze di DNA derivate da moltissimi geni diversi di un dato organismo (potenzialmente tutti), è possibile determinare, con un singolo esperimento, la loro espressione in modo estremamente rapido ed efficace.

Con questo potentissimo strumento di indagine i ricercatori sono in grado, per esempio, di:

- comprendere alcuni aspetti fondamentali dei processi della crescita e dello sviluppo;
- esplorare le cause genetiche di molte malattie;
- identificare nuovi potenziali bersagli per la terapia.

Conoscenze propedeutiche

- Il DNA e la sintesi proteica
- La PCR
- La trascrizione inversa e il cDNA

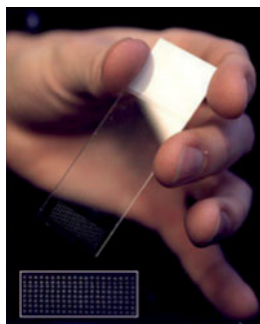



Figura 12.1
Vetrino da microscopia, usato come supporto per immobilizzare migliaia di sequenze nucleotidiche.

Che cos'è un microarray

I microarray di DNA sono dei piccoli supporti solidi (generalmente un vetrino da microscopia di dimensioni 75 x 25 x 1 mm, ma anche dei chip di silicone o delle sottili membrane di nylon) sui quali vengono immobilizzate, in posizioni fisse e note, migliaia di sequenze di DNA derivate da geni diversi (fig. 12.1). Le sequenze di DNA sono depositate sul vetrino in piccolissime quantità (*spot*) o, alternativamente, sono sintetizzate direttamente *in situ*.

Il termine "*to array*" significa "disporre secondo un ordine"; in un microarray le sequenze vengono attaccate al supporto secondo uno schema ordinato prefissato, in modo che sia possibile individuare quale sequenza genica è posizionata in ciascun punto. Le sequenze possono essere DNA, cDNA o oligonucleotidi sintetici (corte sequenze di DNA a singolo filamento, in genere formate da 10-50 nucleotidi).

La tecnica del microarray si basa sull'ibridazione molecolare fra sequenze nucleotidiche complementari. Quando due sequenze complementari si "riconoscono", si formano legami idrogeno tra basi complementari. L'ibridazione avviene tra una sequenza bersaglio (*target*) immobilizzata sul supporto e una sequenza mobile, detta sonda, di mRNA o cDNA marcata con un fluorocromo. Un computer è in grado di misurare con precisione la quantità di sonda legata in ciascuna posizione del vetrino e generare un profilo di espressione genica per ogni tipo cellulare.

Figura 12.2
Schema dei passaggi per la preparazione di un microarray e per il suo utilizzo con sonde di cDNA marcate in verde o in rosso con fluorocromi opportuni.

Programmiamo un esperimento di microarray per confrontare l'espressione genica in due tipi cellulari diversi

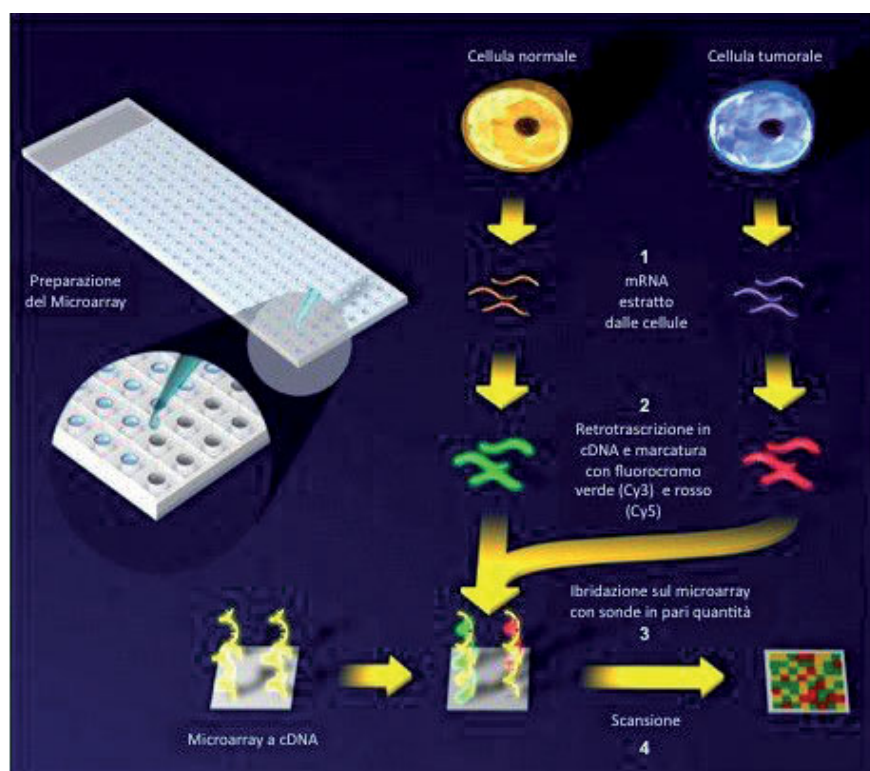
Consideriamo due ipotetiche cellule dello stesso tessuto, ma diverse una dall'altra; ad esempio (fig. 12.2):

- cellula normale (gialla);
- cellula tumorale (azzurra).

Entrambe contengono gli stessi geni ma è importante conoscere il profilo di espressione genica nei due tipi cellulari, perché una diversa espressione può aiutarci a comprendere il meccanismo della trasformazione di una cellulla normale in una cellula tumorale.

La tecnica richiede alcuni passaggi successivi (fig. 12.2):

- isolamento dell'mRNA da ciascun tipo cellulare;
- sintesi del corrispondente cDNA mediante retrotrascizione con l'enzima trascrittasi inversa in presenza di opportuni marcatori fluorescenti (es. verde per la cellula normale e rosso per la cellula tumorale);
- incubazione in contemporanea delle due popolazioni di cDNA marcati sul microarray. Le molecole marcate si legano sul microarray nelle posizioni in cui sono presenti le sequenze corrispondenti ai geni espressi in ciascun tipo cellulare;
- dopo l'ibridazione e una serie di lavaggi, il microarray viene posto in un apposito "lettore" laser dotato di un microscopio speciale e di una "macchina fotografica" in grado di misurare il colore e l'intensità dei diversi "spot".

I fluorocromi, infatti, vengono eccitati dal laser e l'immagine che ne deriva viene catturata dal microscopio e dalla "macchina fotografica" che, insieme, generano una immagine digitale dell'array. Questi dati vengono immagazzinati nel computer ed elaborati da programmi dedicati che, in base all'immagine digitale, calcolano il rapporto della fluorescenza rosso/verde, sottraendo il background (rumore di fondo) per ciascuno spot del microarray. Una volta calcolati i rapporti, la gradazione del colore (dal verde al rosso) dei singoli spot fornisce una stima del livello di espressione dei singoli geni nel campione e nel controllo normale (fig. 12.3).

Storia della scienza

DIVERSE APPLICAZIONI DI MICROARRAY NELLO STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'uso di microarray per lo studio del profilo d'espressione genica è stato pubblicato per la prima volta sulla rivista *Science* nel 1995. Da allora le applicazioni della tecnologia dei microarray sono state molto numerose, ma la principale è l'analisi su larga scala dell'espressione genica.

Studio di stati patologici
Se un gene è sovra-espresso in un determinato stato patologico, lo spot corrispondente risulterà rosso/arancio (poco verde). Identificando i geni la cui espressione (o non espressione) è associata a una determinata malattia, si può costruire un "identikit" per ogni condizione patologica. Il cDNA derivato da un tessuto malato di un paziente può essere ibridato su un microarray per identificare a quale malattia corrisponde il pattern di espressione genica del tessuto patologico in esame. Il risultato dell'analisi può essere utile per confermare (o fare) una diagnosi e per stabilire una terapia appropriata.

Studio delle modifiche dell'espressione genica in un dato periodo della vita cellulare, ad esempio durante il ciclo cellulare
Il ciclo cellulare è regolato da una rete di interazioni molecolari che essenzialmente servono a decidere se e quando una cellula normale entra in divisione. Molti sono i geni che regolano il ciclo cellulare.
In questo sistema di regolazione sono previsti anche dei meccanismi di blocco del ciclo che entrano in azione quando uno dei sistemi di controllo non funziona, a causa di mutazioni in uno dei geni critici, o quando la cellula si trova in condizioni non-ottimali per dividersi. I microarray possono contribuire a identificare i profili di espressione genica nei vari "momenti" del ciclo cellulare, a fare luce sui dettagli del passaggio da una fase all'altra del ciclo, permettendo l'identificazione dei geni che controllano questo orologio cellulare. I risultati di questo tipo di analisi possono fornire, infine, informazioni preziose sui geni le cui mutazioni portano alla crescita tumorale e suggerire nuove strategie di intervento terapeutico.

Sviluppo di nuovi farmaci
Se un determinato gene (o gruppo di geni) è sovra-espresso in una particolare forma di tumore, con i microarray si può determinare se un dato farmaco è in grado di ridurre l'espressione di quel gene (o geni), e se questa riduzione è associata a remissione del tumore. L'analisi con i microarray può anche essere utilizzata per ottimizzare le diagnosi differenziali e per definire a livello molecolare la progressione di un tumore; questa analisi è applicata anche all'identificazione di geni associati a patologie non neoplastiche, come le malattie del sistema immunitario, del sistema nervoso e del sistema respiratorio.

Studio dell'espressione genica nei primi stadi di sviluppo embrionale
I microarray stanno dando un contributo essenziale alla comprensione degli eventi molecolari legati a questo processo. Recentemente sono stati condotti anche diversi studi sul profilo dell'espressione genica che porta alla maturazione delle cellule uovo.

Utilizzando accurate tecnologie di *spotting* robotizzate, su un singolo microarray si può arrivare a caricare 20 000 spot con sequenze diverse! La mole di dati generata da un singolo microarray è quindi molto, molto grande … e la sua interpretazione molto, molto, molto complessa!!!

Figura 12.3
Spot rosso: solo cDNA relativi alle cellule tumorali, dopo ibridazione al DNA target;
Spot verde: solo cDNA relativi alle cellule normali, dopo ibridazione al DNA target;
Spot giallo (rosso + verde = giallo): significa che entrambi i cDNA hanno ibridato in modo equivalente al DNA target;
Spot nero: il gene non è espresso né nelle cellule normali né in quelle tumorali.

Sulla tecnica dei microarray, visitate i siti:

http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/microarray/
Entrate in un laboratorio virtuale, eseguite un esperimento di microarray e analizzate i risultati.

http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html
Simulate al computer un esperimento di microarray in cui sono confrontati i geni espressi da cellule di lievito che crescono in condizioni aerobiche e anaerobiche.

Risultati di alcuni microarray A voi analizzarli e interpretarli

Esercizio 1

Dall'analisi dell'espressione genica di tessuti tumorali di 6 pazienti affetti tutti dallo stesso tipo di tumore, sono emersi i risultati illustrati in figura 12.4 (NB: in questo esercizio la tecnica del microarray è utilizzata per definire il profilo di espressione genica in un tipo di tumore, non per confrontare cellule tumorali e cellule normali).

1) Quali geni sono espressi in tutti i pazienti?
2) Quali geni invece non si esprimono in nessun paziente?
3) Quali geni potrebbero avere un ruolo diretto nello sviluppo di questo tipo di tumore?

Dall'analisi della figura 12.4 si osserva che il gene C è sempre espresso, mentre il gene I è "spento": sono quindi due indicatori comuni a tutti i pazienti. Questo potrebbe suggerire che l'attivazione di C e lo spegnimento di I siano direttamente implicati nello sviluppo del tumore.
Tuttavia, vi siete probabilmente resi conto che è indispensabile fare un confronto tra i microarray ottenuti dall'analisi dei tessuti tumorali e il microarray con gli stessi geni espressi però nel tessuto normale. Infatti C potrebbe essere un gene sempre espresso, così come I potrebbe essere un gene normalmente spento.
La figura 12.5 rappresenta il microarray con l'espressione di questi geni nel tessuto normale da cui deriva il tumore in analisi.

Dal confronto provate a prevedere come appariranno i diversi spot in un microarray con l'espressione di entrambi i tessuti (normale e tumorale) dei 6 pazienti riempiendo la griglia vuota della figura 12.6 con i colori indicati nel "semaforo" in figura 12.3.

Figura 12.4
Microarray di diversi pazienti (indicati con i numeri) affetti da uno stesso tipo di tumore: ciascun microarray è rappresentato da una riga, contenente 10 geni (indicati con le lettere). Gli spot rossi indicano che il gene è espresso, mentre gli spot neri indicano che il gene non è espresso.

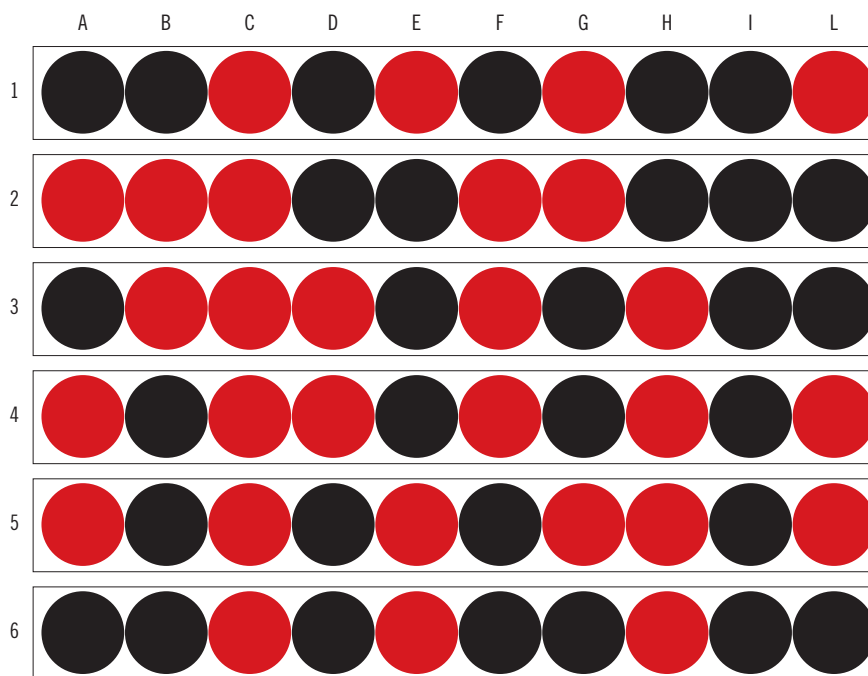



Figura 12.5
Microarray con l'espressione di 10 geni (A-L) nel tessuto normale. Gli spot verdi indicano che il gene è espresso, mentre gli spot neri indicano che il gene non è espresso.

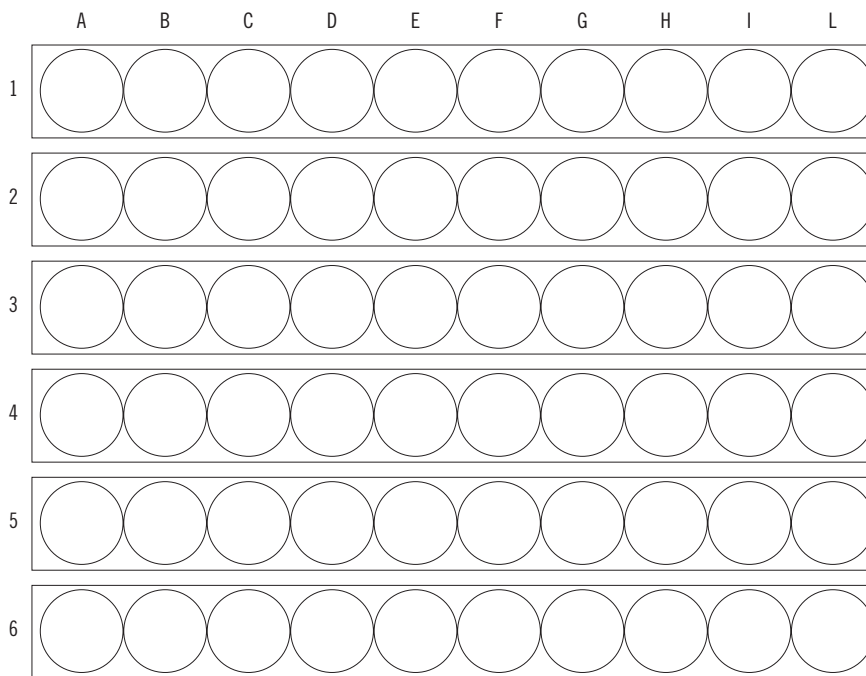



Figura 12.6
I colori dei singoli spot si ottengono dalla sovrapposizione dei microarray dei 6 pazienti della figura 12.4 sul microarray del tessuto normale della figura 12.5 *(ricordare che dalla sovrapposizione di uno spot rosso su uno verde si ottiene uno spot giallo).*

Confrontate poi i vostri risultati con quelli in figura 12.7.

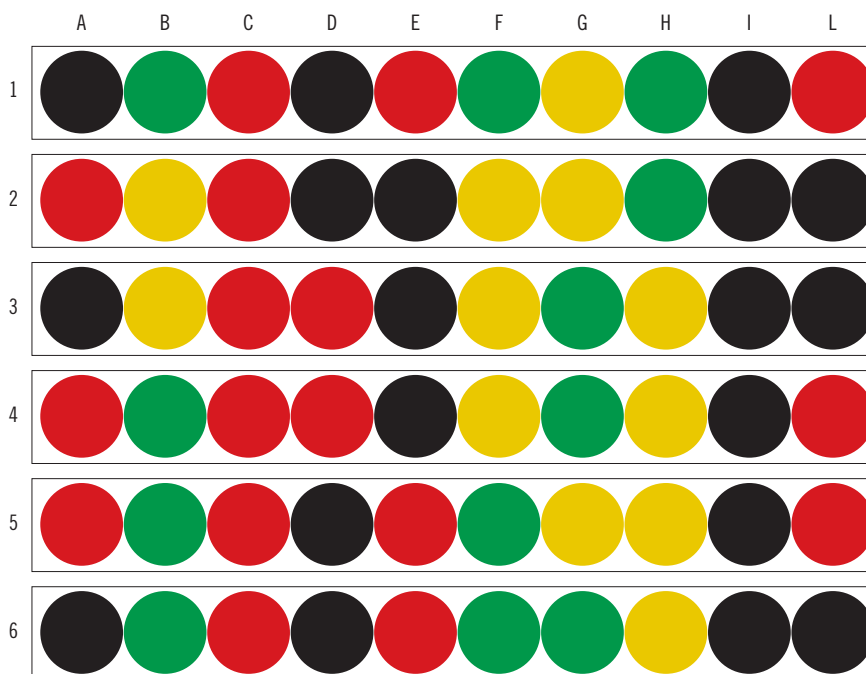



Figura 12.7
Pattern di espressione dei geni A-L nei 6 pazienti dell'esercizio 1.

4) Cosa potete dire ora dei geni che si comportano allo stesso modo nei 6 pazienti?
5) Quale potrebbe essere la loro funzione?

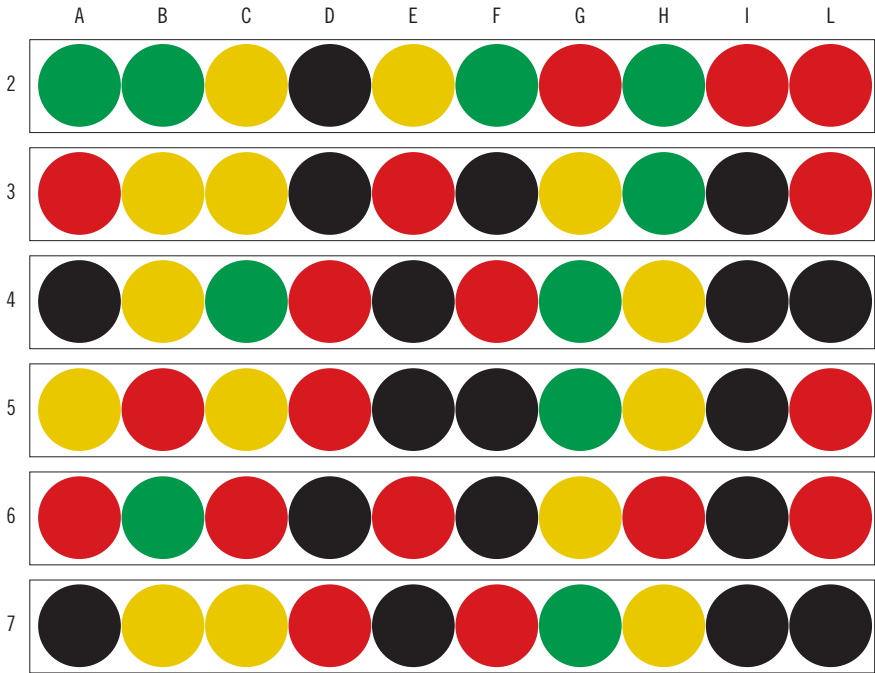
Il gene C è normalmente spento nei tessuti sani e si esprime solo nei tessuti malati, quindi può effettivamente avere un ruolo nello sviluppo di questo tipo di tumore: potrebbe essere un oncogene, ad esempio un gene coinvolto nella crescita di vasi sanguigni (fattore angiogenetico tumorale), oppure un gene che produce telomerasi, un enzima che ricostruisce le estremità telomeriche dei cromosomi, così che la cellula si possa dividere infinite volte. Invece il gene I non si esprime né nel tessuto normale né in quello tumorale e quindi non dà informazioni sullo sviluppo del tumore: in questi microarray può essere usato come gene di controllo, per verificare che la procedura del microarray sia stata svolta correttamente.

Esercizio 2

Nella figura 12.8 è riportato un microarray con l'espressione di 10 geni in tessuto epatico tumorale e normale, prelevati con una biopsia su un paziente affetto da tumore al fegato (il cDNA da tessuto tumorale è marcato in rosso; il cDNA da tessuto sano è marcato in verde).

Il paziente risponde molto bene a un farmaco in via di sperimentazione, la nemorubicina, destinato alla cura del tumore al fegato in pazienti non sensibili alla chemioterapia convenzionale.
Con l'utilizzo di microarray si può cercare di studiare se anche altri tipi di tumore dimostratisi resistenti ai chemioterapici possono essere sensibili alla nemorubicina.
Osservate i pattern di espressione degli stessi geni (A-L) in 6 pazienti con altri tipi di tumore chemioresistenti (fig. 12.9): quale/i tra essi potrebbe/ro rispondere bene alla terapia con nemorubicina?
Tra i pazienti testati, il paziente numero 4 è l'unico che presenta un profilo di espressione dei geni A-L identico al paziente 1 e quindi potrebbe rispondere alla terapia con nemorubicina. Il paziente 7 ha un profilo molto simile: l'unica differenza è il gene C. Anche questo paziente potrebbe essere sensibile alla nuova terapia.

Figura 12.8
Pattern di espressione dei geni A-L in un paziente affetto da tumore al fegato (indicato come paziente 1), che risponde alla terapia con nemorubicina.

Figura 12.9
Pattern di espressione dei geni A-L in 6 pazienti (da 2 a 7) affetti da diversi tipi di tumore tutti resistenti ai chemioterapici tradizionali.

Esercizio 3

In tabella 12.1 viene fornito un elenco di geni con funzioni diverse, che possono essere coinvolti nella formazione di tumori. Leggete attentamente la funzione del gene, decidete se sarà più espresso nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali o viceversa e cercate di spiegare il perché (controllate le vostre risposte con quelle nella tabella scaricabile dal sito).

Ora tocca a voi: provate a fare la diagnosi in questi 3 casi clinici.

Avete le biopsie di tre pazienti che dovete analizzare per scoprire se sono presenti cellule tumorali. Immaginate di prelevare le cellule dal tessuto dei vostri pazienti, di coltivarle, di purificare mRNA dal citoplasma, trasformarlo in cDNA e utilizzarlo come sonda per il microarray contenente i geni elencati nella tabella 12.1. (NB: in questo esercizio la tecnica del microarray è utilizzata per definire il profilo di espressione genica in un tipo di tumore, non per confrontare cellule tumorali e cellule normali).

Il risultato dell'analisi dell'espressione dei geni interessati è visibile nelle tabelle seguenti, relativi ai tre pazienti X, Y e Z (l'espressione del gene è indicata da un pallino nero). Qual è la vostra diagnosi per i tre pazienti?

paziente X

	A	B	C
1		•	•
2	•		
3	•	•	•
4			•

paziente Y

	A	B	C
1	•		
2		•	•
3			•
4	•	•	•

paziente Z

	A	B	C
1	•	•	
2	•	•	
3	•		•
4	•		•

Il paziente X esprime 7 geni (A2, A3, B1, B3, C1, C3, C4): 2 geni di controllo (sempre attivi) e 5 geni che non sono coinvolti nella formazione di tumore e possono essere espressi nelle cellule normali. Si può concludere che la biopsia del paziente X non contiene cellule tumorali.

Il paziente Y esprime 7 geni (A1, A4, B2, B4, C2, C3, C4), 5 dei quali sono geni coinvolti nella formazione e/o nel processo di metastatizzazione del tumore e 2 sono geni di controllo. Pertanto, per il paziente Y si può fare una diagnosi di tumore.

Il paziente Z esprime 8 geni: A1, A4, e B2 sono 3 geni che si esprimono in caso di tumore, mentre A2, A3 e B1 sono geni che si esprimono nei tessuti sani. I geni C3 e C4 sono geni di controllo. Non è possibile quindi fare una diagnosi certa avendo una situazione di perfetta parità di espressione tra geni coinvolti e non coinvolti nel processo di trasformazione.

NOME DEL GENE	FUNZIONE DEL GENE	PREVISIONE: L'ESPRESSIONE DEL GENE È AUMENTATA O RIDOTTA NELLE CELLULE TUMORALI?	SPIEGAZIONE DELLA PREVISIONE
A1	Un oncogene che produce una proteina che funziona da acceleratore in una via di trasmissione del segnale di crescita cellulare		
A2	Un gene soppressore di tumore che produce una proteina che funziona da freno in una via di trasmissione del segnale di crescita cellulare		
A3	Il gene "guardiano" che produce la proteina p53 che identifica i danni del DNA e innesca l'apoptosi se il danno al DNA non può essere riparato		
A4	Il gene della telomerasi, un enzima indispensabile per la completa replicazione delle estremità dei cromosomi (telomeri). Le cellule senza attività telomerasica diventano senescenti e muoiono		
B1	Un gene che produce un enzima coinvolto nella riparazione dei danni al DNA		
B2	Un gene che produce un fattore angiogenetico, cioè una proteina che induce la formazione di vasi sanguigni; questi geni sono spenti nei tessuti adulti normali		
B3	Un gene di una proteina di membrana che fa aderire le cellule una all'altra all'interno di un tessuto, e previene "l'evasione" del tumore dal suo sito primario (metastasi)		
B4	Un oncogene che produce un recettore di membrana che trasmette in modo incontrollato un segnale di crescita		
C1	Un gene che produce un recettore di membrana per un segnale di rallentamento della crescita		
C2	Un gene di un fattore trascrizionale che attiva la trascrizione di geni critici per la replicazione del DNA		
C3	Un gene che produce una proteina che trasforma l'ADP in ATP (ATPsintasi)		
C4	Un gene che produce una proteina del citoscheletro		

Tabella 12.1

Esercizio 4

Immaginate di avere a disposizione due repliche di uno stesso microarray su cui sono state depositati 20 spot relativi a 20 geni la cui funzione è rilevante nel tessuto mammario. I geni sono denominati con le lettere A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T. Ciascun chip è stato messo a contatto con cDNA ottenuto da mRNA estratto da cellule normali (controllo), marcato con un tracciante verde e contemporaneamente con cDNA ottenuto da mRNA, estratto da cellule tumorali, marcato con un tracciante rosso.

Anche in queste analisi, uno spot verde indica che il gene è attivo nel tessuto normale. Uno spot rosso indica che il gene è attivo nel tumore. I colori intermedi indicano che il gene in questione è attivo in entrambi i tipi cellulari con diversi gradi di espressione che producono le diverse sfumature. Il colore giallo indica che il gene è ugualmente espresso nel tumore e nelle cellule normali. Il colore nero indica che il gene non è espresso, né nelle cellule normali né nelle cellule tumorali.

Scopo dell'esercizio è quello di identificare un profilo di espressione tumore-specifico e, possibilmente, correlare il profilo di espressione con la malignità. Vengono messi a confronto i profili di espressione di due tipi di tumore mammario (figura 12.10), il carcinoma papillare *in situ* e il carcinoma infiltrante (ricordate che il carcinoma infiltrante ha un grado di malignità superiore al carcinoma *in situ*). Facendo riferimento alla figura 12.10 assegnate ad ogni spot un punteggio, e inseritelo nelle celle della tabella 12.2:

Tabella 12.2
La parte (a) della tabella si riferisce al carcinoma mammario *in situ*; la parte (b) si riferisce al carcinoma mammario infiltrante.

Per visualizzare in modo più immediato le differenze di espressione nei due tipi di tumore, costruite un grafico a colonne con i punteggi da voi assegnati ai singoli spot (A-T), utilizzando la griglia della figura 12.11. Per distinguere i profili di espressione dei due tumori, usate colori diversi (carcinoma *in situ*, colore blu, carcinoma infiltrante, colore viola).
Confrontate i punteggi da voi assegnati e il grafico risultante con la tabella 12.3 e con la figura 12.12;

a)

b)

Figura 12.10
Nei due chip gli estratti tumorali rispettivamente di carcinoma mammario in situ (a) e di carcinoma mammario infiltrante (b) vengono confrontati con cellule normali del dotto mammario.

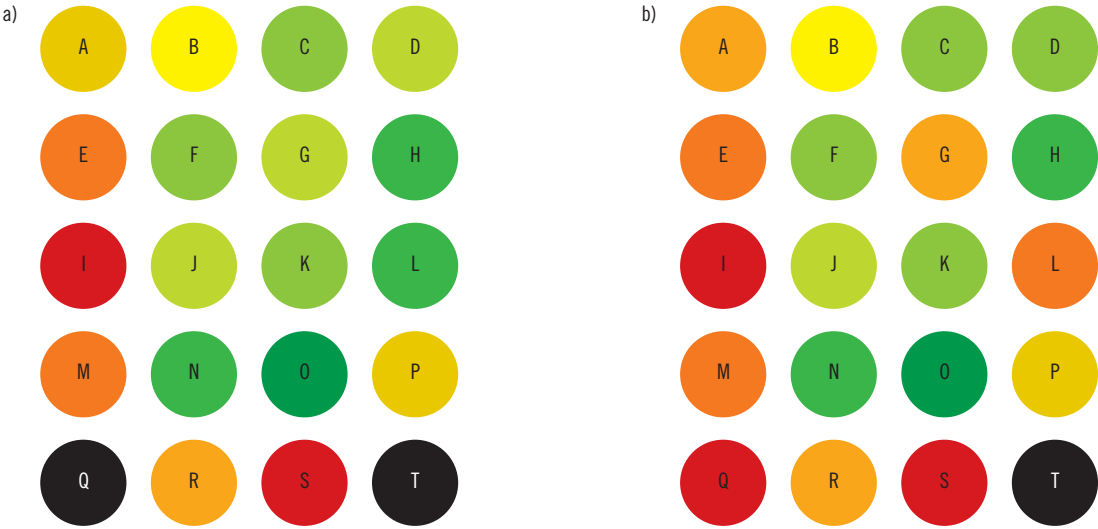
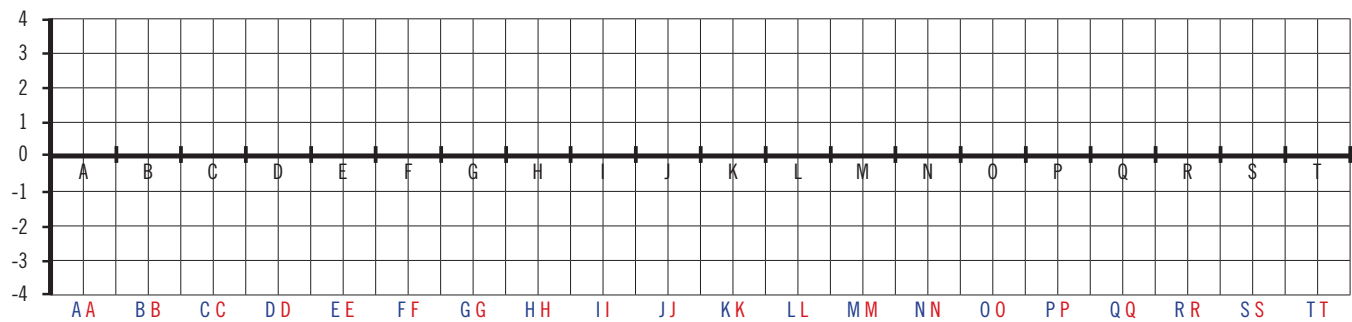



Figura 12.11

Quali osservazioni potete fare sull'espressione differenziale dei geni analizzati nei due tipi di tumore?

(+1)	(0)	(-2)	(-1)	(+2)	(0)	(-2)	(-2)
(+3)	(-2)	(-1)	(-3)	(+3)	(-2)	(+2)	(-3)
(+4)	(-1)	(-2)	(-3)	(+4)	(-1)	(-2)	(+3)
(+3)	(-3)	(-4)	(+1)	(+3)	(-3)	(-4)	(+1)
(0)	(+2)	(+4)	(0)	(+4)	(+2)	(+4)	(0)

Tabella 12.3

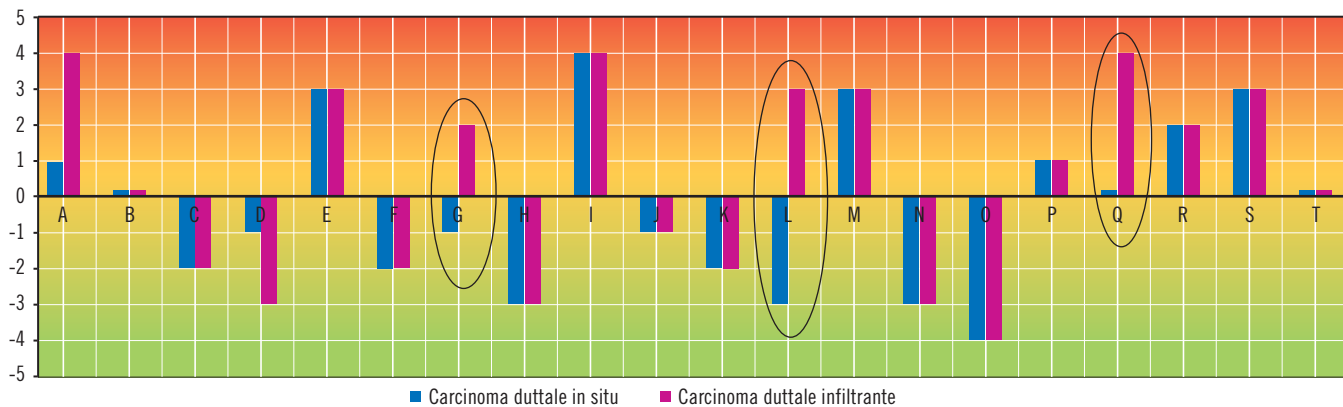



Figura 12.12
Grafico a colonne dei profili di espressione dei due tipi di carcinoma mammario (carcinoma *in situ*, colonne blu, carcinoma infiltrante, colonne viola).

- i geni con punteggio negativo sono poco espressi nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali;
- i geni con un punteggio positivo sono geni espressi maggiormente nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali;
- i geni con un punteggio uguale a zero sono geni espressi egualmente nelle cellule tumorali e nelle cellule normali.

Per fare una diagnosi differenziale fra i due tipi di tumori e/o per correlare uno schema di espressione con la malignità è interessante identificare quei geni che hanno comportamento diverso nei due tipi di tumore.

Il gene G e ancora di più il gene L sono sovraespressi nelle cellule del carcinoma infiltrante e sotto-espressi nelle cellule del carcinoma papillare *in situ*.

Il gene Q è attivo solo nelle cellule del carcinoma infiltrante, mentre è inattivo nel carcinoma in situ.

In conclusione, se questo quadro fosse confermato su un numero significativo di casi, i geni G, L e Q potrebbero diventare dei marcatori diagnostici per distinguere questi due tipi di tumore.

1. Chi è il colpevole?
2. Identificazione di un OGM
3. Sano o malato?

ELETTROFORESI DEL DNA SU GEL DI AGAROSIO

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 µl
- puntali
- beuta da 100 ml
- cilindro graduato da 50 ml
- bilancia
- forno a microonde
- apparato per elettroforesi
- nastro adesivo di carta
- alimentatore
- centrifuga
- transilluminatore
- occhiali in plexiglass

Reagenti e materiali biologici[1]

- **TBE 1χ**[1]
- DNA prodotti con PCR (già pronti)
- Marcatore di peso molecolare (DNA del plasmide pUC8 tagliato con l'enzima di restrizione *HaeIII*)
- Agarosio in polvere (0,60 g)
- Intercalante del DNA (SYBR Safe)
- **Colorante di caricamento 6χ**
- Acqua distillata sterile

Preparazione del gel di agarosio

Nota di laboratorio: la concentrazione di agarosio nel gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare mediante elettroforesi. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2000 pb (paia di basi), si utilizza un gel di agarosio al 2% (w/v).

- Preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di nastro adesivo di carta.
- Verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia correttamente "in bolla".
- Misurare 30 ml di tampone TBE 1× in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 0,60 gr di agarosio.
- Pesare la beuta contenente la soluzione di agarosio e prendere nota del peso.
- Leggere attentemente la "Nota di sicurezza sulla utilizzazione del forno a microonde".
- Sciogliere l'agarosio nel forno a microonde impostato sulla potenza di circa 500 V per 1 minuto. Aprire i il forno, agitare delicatamente la soluzione con una protezione, facendo attenzione a non scottarsi. Richiudere il forno a microonde e sciogliere la soluzione per un ulteriore minuto alla stessa potenza.

[1] Per la preparazione di tutti i reagenti indicati in grassetto nell'Appendice si rimanda alla fine dell'Appendice stessa.

- Pesare la soluzione di agarosio (l'acqua del tampone, bollendo, è evaporata!) e riportare la soluzione di agarosio al peso originale, utilizzando una spruzzetta con H_2O distillata. Attenzione: far cadere l'acqua delicatamente, facendola scivolare lungo i bordi della beuta evitando la formazione di bolle.
- Aggiungere 3 µl di intercalante del DNA (SYBR Safe) nella beuta con l'agarosio.
- Aspettare 3-5 minuti, coprendo la beuta contenente la soluzione di agarosio con un pezzetto di stagnola per evitare l'evaporazione. L'agarosio deve raggiungere una temperatura intorno ai 60 °C, altrimenti rovina il supporto di plastica della vaschetta dell'elettroforesi.
- Versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito un pettine che serve per formare dei pozzetti nei quali saranno depositati i campioni da analizzare. I pozzetti si formano quando, solidificato il gel, viene tolto il pettine.
- Lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 minuti. Quando il gel è solidificato diventa opaco.
- Togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella elettroforetica.
- Versare il tampone TBE 1× nella camera di corsa, evitando che si formino bolle, fino a coprire completamente il gel. Se si formano bolle, toglierle con la punta di una micropipetta.
- Togliere lentamente il pettine, agendo perpendicolarmente rispetto al gel stesso.

Corsa elettroforetica

A ciascuno studente viene consegnata una provetta eppendorf contenente 10 µl di DNA (circa 200 ng); la tabella riassume gli schemi di caricamento per i diversi esperimenti.

CHI È IL COLPEVOLE?	PM (Peso molecolare)	V (vittima)	SC (scena crimine)	S1 (sospettato 1)	S2 (sospettato 2)	S3 (sospettato 3)		Bianco di PCR
IDENTIFICAZIONE DI UN OGM		1 (cloroplasto)	2 (zeina)	3 (campione)	4 (controllo +)	5 (controllo -)		
SANO O MALATO?		1 (individuo III1)	2 (individuo III2)	3 (individuo IV1)	4 (individuo IV2)	5 (individuo IV3)	6 (individuo IV4)	

- Scrivere su ciascuna provetta con un pennarello resistente all'acqua una sigla identificativa del campione.
- Aggiungere 2 µl di colorante di caricamento 6× e risospendere con la micropipetta, evitando di formare bolle. Il glicerolo presente nel colorante di caricamento serve a rendere più densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e, quindi, a facilitare la deposizione del campione nel pozzetto.
- Se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga eppendorf.
- Caricare lentamente ciascun campione (12 µl) nei singoli pozzetti (ogni pozzetto ha un volume di circa 15 µl), ponendosi con la punta della micropipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolarmente rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione dal pozzetto.
- In un pozzetto laterale caricare i marcatori di DNA a peso molecolare noto.
- Chiudere il coperchio della cella elettroforetica.
- Collegare i morsetti dei cavi ai poli del generatore di corrente, detto anche "alimentatore" o *power supply*. Il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo.
- Fissare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 40 minuti.
- Osservare la migrazione dei coloranti presenti nella soluzione di caricamento per valutare la migrazione del DNA che, essendo incolore, non si può vedere. Il blu di bromofenolo (più scuro) migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 100 pb, mentre lo xilene cianolo (più chiaro) migra alla stessa velocità di un frammento di circa 800-900 pb.

Attenzione: fermare la corsa elettroforetica quando il blu di bromofenolo si trova a circa 1-2 cm dalla fine del gel, in modo da evitare che il DNA esca dal gel stesso. Se dovesse succedere, si perdono i campioni di DNA!

Operazioni da svolgere alla fine della corsa elettroforetica

- Al termine della corsa indossare guanti monouso e togliere delicatamente il gel dalla cella elettroforetica trasferendolo sul transilluminatore.
- Osservare il gel al transilluminatore, proteggendo gli occhi dai raggi UV con appositi occhiali.
- Documentare il risultato del gel, facendo una fotografia (ricordarsi di portare una macchina fotografica digitale!).
- Il tampone della corsa elettroforetica può essere riutilizzato alcune volte. Recuperare il tampone usato versandolo in una bottiglia con l'aiuto di un imbuto.

4. Clonaggio del DNA. Bianco o blu?

PROTOCOLLO SPERIMENTALE DEL CLONAGGIO DEL DNA

ATTIVITÀ 1: BIANCO O BLU?

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 µl
- micropipette 20/200 µl
- micropipette 100/1000 µl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- piastre
- spatole sterili
- stufa a 37 °C
- termoblocco a secco
- stuzzicadenti sterili

Reagenti e materiali biologici[1]

- Cellule di *Escherichia coli* XL1 Blue rese competenti con un trattamento con $CaCl_2$: aliquote da 200 µl congelate a –80 °C in provette eppendorf
- **Miscela di ligazione**
- Vettore pUC19
- H_2O distillata sterile
- **LB** sterile in provette da 15 ml
- Piastre con **LB + agar + ampicillina**
- **IPTG 0,1 M**
- **X-GAL 40 mg/ml**
- **ampicillina 10 mg/ml**

Trasformazione batterica

Per effettuare la trasformazione batterica, ogni gruppo di studenti riceverà:

- sospensione di cellule di *E. coli* XL1 Blue competenti: un'aliquota da 200 µl per ogni studente;
- la miscela di ligazione (contenente il plasmide pUC19 linearizzato con l'enzima di restrizione *EcoRI* e un frammento di DNA genomico, anch'esso tagliato con *EcoRI*);
- il vettore pUC19;
- acqua sterile.

☐ Lasciare scongelare in ghiaccio le cellule competenti.
☐ Risospendere delicatamente le cellule con piccoli colpi delle dita sulla provetta.
☐ Siglare le provette con un pennarello waterproof con numeri progressivi (da 1 a ...*n*, a seconda del numero di repliche che sono allestite) per la trasformazione con la miscela di ligazione, (+) per il controllo positivo, (–) per il controllo negativo.

1 Per la preparazione dei reagenti in grassetto si rimanda alla fine dell'appendice.

☐ In base a come è contrassegnata, ogni studente aggiungerà alla propria provetta contenente le cellule:

1….*n*	10 μl di miscela di ligazione	
+	10 μl di vettore pUC19 (1 ng totale)	controllo positivo
-	10 μl di acqua	controllo negativo (-DNA)

☐ Incubare in ghiaccio per 20 minuti.
☐ Trasferire nel termoblocco a secco a 37 °C per 5 minuti (fase di *heat shock*).
☐ Porre per 1 minuto in ghiaccio.
☐ Aggiungere sterilmente 800 μl di LB medium senza antibiotico (volume finale: circa 1 ml).
☐ Incubare in termoblocco a 37 °C per 30 minuti (tempo di espressione del gene amp^R).

Nel frattempo, distribuire a ogni studente una piastra contenente LB con agar e ampicillina.
☐ Preparare per ogni piastra una miscela di:
- 40 μl di IPGT 0,1 M;
- 20 μl di X-GAL 40 mg/ml.

Per far questo conviene preparare una miscela contenente le due soluzioni
nelle opportune proporzioni (2 IPGT : 1 X-GAL) e pipettarne 60 μl su ciascuna piastra. (N.B.: distribuire il liquido in modo uniforme sulla superficie della piastra, utilizzando l'apposita spatola sterile).
☐ Trascorsi i 30 minuti di incubazione delle cellule, piastrare diverse quantità di cellule trasformate con la miscela di ligazione: ad esempio: 50 μl, 100 μl, 150 μl, 200 μl
☐ Allestire un controllo negativo piastrando 100 μl di cellule trasformate con acqua distillata sterile.
☐ Allestire un controllo positivo, piastrando 100 μl di cellule trasformate con pUC19
(N.B. distribuire le cellule in modo uniforme sulla piastra utilizzando l'apposita spatola sterile).
☐ Capovolgere le piastre (per evitare che in stufa la condensa cada sulle cellule) e incubarle in stufa a 37 °C per una notte.

Conteggio del numero di colonie batteriche trasformate

Il conteggio del numero di colonie batteriche trasformate presenti in una singola piastra serve per calcolare il livello di competenza delle cellule batteriche, ossia l'efficienza di trasformazione batterica (numero di cellule trasformate/μg di DNA).
Il conteggio del numero di colonie presenti viene effettuato sulla piastra di controllo positivo, in cui sono stati piastrati 100 μl (1/10) della sospensione di cellule trasformate con 1 ng di pUC19, e quindi trasformate con 0,1 ng di DNA.

☐ Capovolgere la piastra in modo che il coperchio appoggi sul banco di lavoro.
☐ Con un pennarello dividere la piastra in 4 settori uguali.
☐ Contare il numero di colonie presenti in due settori e fare la media dei due valori.
☐ Moltiplicare il valore medio ottenuto per 4 (si ottiene il numero di colonie totali/piastra).
☐ Calcolare l'efficienza di trasformazione:

(n° colonie/0,1 ng DNA) × 10 000
(ricordarsi che 1 μg = 1 000 ng).

Esempio: supponiamo che il numero di colonie totali/piastra sia risultato pari a 100. Dal momento che era stato piastrato 1/10 di sospensione di cellule trasformate, il numero totale di batteri trasformati nella provetta è: 100 × 10 = 1000 e l'efficienza di trasformazione è pari a 10^6 colonie trasformate/μg DNA.

Allestimento di una minicoltura batterica

Per confermare che le colonie batteriche bianche contengano davvero un vettore che ha incorporato un inserto, è necessario estrarre il DNA plasmidico dalle colonie trasformate e analizzare le

dimensioni dell'inserto; si procede allestendo una minicoltura batterica in terreno liquido, per amplificare il numero di cellule da cui estrarre il plasmide.

- ☐ Mettere 0,5 ml di terreno di coltura con ampicillina in una provetta da 1,5 ml.
- ☐ Identificare una colonia batterica, sia essa bianca o blu, purché sia singola e ben separata dalle altre colonie.
- ☐ Con uno stuzzicadenti sterile prelevare la colonia batterica e stemperarla nel terreno di coltura.
- ☐ Chiudere la provetta e incubare per una notte a 37 °C.

ATTIVITÀ 2: RICOMBINANTE O NON RICOMBINANTE?

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 µl
- micropipette 20/200 µl
- micropipette 100/1000 µl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- beuta da 100 ml
- cilindro graduato da 50 ml
- bilancia
- forno a microonde
- apparato per elettroforesi
- nastro adesivo di carta
- alimentatore
- centrifuga
- vortex
- stufa a 37 °C
- transilluminatore
- termoblocco a secco

Reagenti e materiali biologici

- Minicolture batteriche precedentemente preparate (Attività 1)
- **Soluzione A**
- **Proteinasi K 20 mg/ml**
- **Lisozima 10 mg/ml, sterilizzato mediante filtrazione**
- **TE + RNasi A 50 µg/ml**
- Alcol isopropilico (isopropanolo)
- **TBE 1χ**
- Agarosio in polvere
- Intercalante del DNA (SYBR Safe)
- **Colorante di caricamento 6χ**
- **Etanolo 70%**
- H_2O distillata sterile
- Tampone di digestione di *EcoRI* 10χ
- Enzima *EcoRI* (5 U/ml)
- Marcatore di peso molecolare lineare: 1 kb DNA ladder

MINIPREP DI DNA PLASMIDICO: METODO BOILING

Questo esperimento ha lo scopo di estrarre il DNA plasmidico, al fine di confermare se esso è ricombinante oppure no.

La lisi delle cellule avviene con un trattamento al calore (donde il nome *boiling* dato a questo metodo di estrazione di DNA plasmidico).

Estrazione del DNA plasmidico

- ☐ Centrifugare la mini-coltura batterica 5 minuti a 13 000 rpm (rivoluzioni per minuto) ed eliminare il surnatante; la provetta va poi fatta sgocciolare sulla carta assorbente.
- ☐ Risospendere il pellet con 530 µl di soluzione A già addizionata con 1 µl di proteinasi K.
- ☐ Miscelare con la micropipetta per risospendere le cellule.
- ☐ Addizionare 25 µl della soluzione di lisozima.
- ☐ Miscelare per inversione (5 volte).
- ☐ Incubare per 10 minuti a 95 °C in un termoblocco a secco.
- ☐ Centrifugare 10 minuti a 13 000 rpm.
- ☐ Trasferire il surnatante in una nuova provetta.

Precipitazione del DNA

- ☐ Al surnatante addizionare 450 µl di isopropanolo.
- ☐ Passare su vortex.
- ☐ Tenere 5 minuti a temperatura ambiente.
- ☐ Centrifugare 5 minuti a 13 000 rpm, eliminare il surnatante.
- ☐ Addizionare 400 µl di etanolo 70%.
- ☐ Centrifugare 5 minuti a 13 000 rpm, eliminare il surnatante.
- ☐ Asciugare il pellet in un termoblocco a secco.
- ☐ Risospendere con 50 µl TE + RNasi A.
- ☐ Passare su vortex.
- ☐ Incubare 10 minuti a 37 °C.

Digestione con un enzima di restrizione

Una volta estratto il DNA plasmidico dalle cellule batteriche trasformate, bisogna determinare se il plasmide è ricombinante (contiene un inserto) oppure no. Il colore della colonia batterica (bianco o blu) è già un indizio; tuttavia la presenza dell'inserto nel vettore estratto dalle colonie batteriche bianche deve essere verificata. Per fare ciò è necessario effettuare la digestione con un enzima di restrizione che consenta di "ritagliare" (ossia escidere) l'inserto dal vettore. L'inserto viene escisso con lo stesso enzima di restrizione utilizzato per clonarlo.

- ☐ Prelevare 3 µl (equivalente a circa 3 ng di DNA) di DNA plasmidico risospeso in TE+RNasi A.
- ☐ Aggiungere 1 µl di tampone di digestione di *EcoRI* 10×.
- ☐ Aggiungere 1 µl di enzima *EcoRI* (5 U/ml).
- ☐ Aggiungere 5 µl di acqua distillata sterile.
- ☐ Incubare 30 minuti a 37 °C.

Elettroforesi del DNA

In questo esperimento l'elettroforesi del DNA ha lo scopo di:

- ☐ verificare la presenza di DNA plasmidico nella miniprep;
- ☐ verificare se si tratta di un plasmide ricombinante oppure no;
- ☐ nel caso di un plasmide ricombinante, determinare il peso molecolare dell'inserto.

Preparazione dei campioni

Scrivere su ciascuna provetta da 1,5 ml con un pennarello waterproof il tipo di campione che vi verrà trasferito:

B = plasmide estratto da colonia blu, non digerito;
W = plasmide estratto da colonia bianca, non digerito.

Preparazione del gel di agarosio

Dovendo separare molecole circolari di plasmide di qualche kb (chilobasi, 1000 coppie di basi) e

frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2000 pb (paia di basi), si utilizza un gel di agarosio allo 0,8%: pertanto preparare il gel secondo le indicazioni del Protocollo "Elettroforesi del DNA", sciogliendo 0,24 g di agarosio in 30 ml di tampone TBE 1χ.

Corsa elettroforetica

Seguire le indicazioni contenute nel Protocollo "Elettroforesi del DNA".
Nota bene: in questo esperimento, essendo diversa la concentrazione del gel di agarosio, la migrazione del colorante di caricamento ha diverse velocità: il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 pb, mentre lo xilene cianolo migra alla stessa velocità di un frammento di circa 9000 pb.

5. Mais blu. Dal fenotipo al genotipo

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

ATTIVITÀ 1: DAL SEME DEL MAIS AL FENOTIPO

GERMINAZIONE DEI SEMI
Apparecchiature e strumentazioni

- vaschetta in plexiglass con coperchio di cm 50 × 60 × 20
- carta da filtro
- teli scuri

Reagenti e materiali biologici

- Almeno 50 semi di mais
- Ipoclorito di sodio 7%
- Acqua distillata

Figura 1
Posizione dell'embrione in una cariosside di mais.

I semi vengono suddivisi in colorati e incolori, sterilizzati in una soluzione di ipoclorito di sodio al 7% (la candeggina commerciale) per circa 20 minuti e quindi sciacquati abbondantemente in acqua distillata.
La germinazione avviene al buio a temperatura ambiente (20-25 °C), in vasche di plexiglass su carta da filtro (tre fogli di carta da filtro per vasca) bagnata con acqua di rubinetto (non distillata perché ritarda la germinazione). Prima di bagnare la carta, si suddividerà (tracciando con la matita) la superficie a disposizione in due porzioni, per tenere separati i semi colorati dagli incolori. I semi vengono disposti con l'embrione verso l'alto (fig. 1) e coperti con un singolo foglio di carta da filtro. Si bagna fino alla completa imbibizione della carta da filtro, accertandosi che non rimanga acqua libera nella vasca, perché potrebbe inibire la germinazione dei semi. Si chiude la vasca con una lastra di vetro e la si mette al buio. Quando i semi sono germinati, dopo circa 4 giorni a 26 °C, la vasca è esposta alla luce per circa 5-7 giorni per permettere lo sviluppo delle plantule e l'accumulo di pigmenti antociani nelle radici (fig. 2), controllando, circa ogni due giorni, che la carta da filtro sia sempre bagnata.

Figura 2
Piantine di mais in vasca di germinazione.

Analisi del fenotipo

Una volta cresciute le piantine, contando i tre diversi fenotipi, è possibile verificare la segregazione degli alleli del gene R1 come attesa in una generazione F2 con il test del χ^2, che prevede l'applicazione della formula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(o-a)^2}{a}$$

Inoltre, tra le piantine si sceglieranno quelle da analizzare a livello molecolare nella seconda parte dell'attività, prendendo nota del fenotipo (colore della cariosside e colore della radice).

ATTIVITÀ 2: ANALISI MOLECOLARE DI UN MARCATORE GENETICO
Protocollo per l'estrazione del DNA genomico da foglia

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 µl
- micropipette 20/200µl
- micropipette 100/1000 µl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- provette da 2 ml
- provette da 0,2 ml per PCR
- pestelli conici in teflon
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- beuta da 100 ml
- cilindro graduato da 50 ml
- bilancia
- forno a microonde
- apparato per elettroforesi
- alimentatore
- centrifuga
- vortex
- stufa a 37 °C
- termociclatore
- transilluminatore
- termoblocco a secco

Reagenti e materiali biologici[1]

- Piantine di mais
- **Extraction Buffer** (EB)
- **SDS 20%**
- **Ammonio acetato 5M**
- Alcol isopropilico (isopropanolo)
- Etanolo 70%
- **TE + RNAsi 50 µg/ml**
- **Tampone TBE (Tris-Borato-EDTA) 1χ**
- Agarosio in polvere
- Intercalante del DNA (SYBR Safe)
- **Colorante di caricamento per gel di agarosio 6χ**
- H_2O distillata sterile
- Marcatore di peso molecolare

Estrazione di DNA genomico

- ☐ Porre un pezzo di foglia (~2cm^2), tagliato con le forbici, in una eppendorf da 2 ml sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione.
- ☐ Addizionare 375 µl di EB e 25 µl di SDS 20%.
- ☐ Macinare il tessuto con un pestello.
- ☐ Incubare in stufa alla temperatura di 60 °C per circa 30 minuti.
- ☐ Preparare delle nuove provette eppendorf da 1,5 ml per il passaggio successivo riportando i codici identificativi precedentemente assegnati ai propri campioni.
- ☐ Centrifugare per 15 minuti a 13 000 giri (rpm, rivoluzioni per minuto).
- ☐ Trasferire 150 µl di surnatante nella nuova eppendorf preparata precedentemente.

[1] Per la preparazione dei reagenti in grassetto si rimanda alla fine dell'Appendice.

- ☐ Addizionare 150 μl di ammonio acetato e 300 μl di isopropanolo.
- ☐ Miscelare invertendo le eppendorf.
- ☐ Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
- ☐ Centrifugare per 10 minuti a 13 000 rpm.
- ☐ Eliminare il surnatante stando attenti che il pellet rimanga attaccato all'eppendorf.
- ☐ Lavare il pellet addizionando 500 μl di etanolo 70% e centrifugare per 5 minuti a 13 000 rpm.
- ☐ Eliminare il surnatante e lasciare asciugare il pellet (attaccato all'eppendorf) in stufa a 60 °C per 5-10 minuti.
- ☐ Quando il pellet è completamente secco, risospenderlo in 30 μl di TE con RNasi.
- ☐ Incubare 10 minuti a 37 °C.
- ☐ Per la PCR usare 2 μl di DNA genomico, il resto può essere conservato a –20 °C.

PCR SUL DNA GENOMICO ESTRATTO

Schema della PCR

La reazione di amplificazione viene effettuata in un volume finale di 25 μl contenente DNA e una miscela (MIX) di tutti i reagenti necessari allo svolgimento della reazione.
Componenti della MIX:

- 2,5 μl Taq Buffer 10χ
- 0,5 μl dNTP (10 mM)
- 0,5 μl + 0,5 μl primer bnlg1028 (forward e reverse), concentrazione 10 pmoli/μl (10 mM)
- 0,2 μl Taq DNA Polymerase (5 U/μl)
- 18,80 μl H_2O distillata sterile
- Totale 23 μl

I primer per bnlg 1028 sono riportati nella seguente tabella (temperatura di appaiamento specifica 57 °C):

Primer forward	AGGAAACGAACACAGCAGCT
Primer reverse	TGCATAGACAAAACCGACGT

Dato che i volumi di ciascun reagente della MIX sono molto piccoli, si consiglia di preparare un volume di MIX sufficiente per allestire 10 campioni da amplificare.

- Preparare le provette da 0,2 μl su cui va riportato il codice identificativo del campione.
- Trasferire 23 μl della MIX e 2 μl di DNA genomico nella provetta.
- Allestire un controllo negativo con 20 μl di MIX (senza DNA).
- Tenere le provette in ghiaccio fino al momento di metterle nel termociclatore.

Importante: ricordarsi di sostituire i puntali ogni volta che si prelevano i diversi reagenti e ogni volta che si trasferisce la MIX nelle singole provette!

Lo schema generale del programma di PCR è il seguente :

T°	T´		
94 °C	2´ 30´´	1 unico ciclo iniziale di denaturazione	
94 °C	45´´	denaturazione	32 cicli
57 °C	1´	appaiamento o annealing	
72 °C	1´30´´	estensione	
72 °C	5´	estensione	
4 °C	∞	(conservazione dei campioni)	

Una volta finita l'amplificazione, dopo circa 2 ore, i campioni vengono caricati nel gel per la corsa elettroforetica (*vedi* Protocollo "Elettroforesi del DNA").

6. Analisi cromosomiche

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Apparecchiature e strumentazione

- vetrini portaoggetto molati-sabbiati
- vaschette in vetro borosilicato per colorazione vetrini "Hellendhal" con coperchio
- vaschette per risciacquo in polimetilpentene "Hellendhal"
- pinzette
- Pasteur di vetro
- tettarelle in lattice per pipette Pasteur
- microscopio
- pennarelli indelebili
- fogli da lucido
- carta assorbente

Reagenti e materiali biologici

- Etanolo assoluto
- Acqua distillata sterile
- Colorante Giemsa (Carlo Erba)
- Sospensioni di linfociti B in soluzione di fissaggio

Striscio su vetrino

La sospensione cromosomica viene strisciata su un vetrino sgrassato e lavato, effettuando i seguenti passaggi.

- ☐ Prelevare con una pinzetta un vetrino portaoggetto da un becker contenente etanolo assoluto.
- ☐ Asciugarlo perfettamente con un telo di lino.
- ☐ Con una matita scrivere il proprio nome sulla parte molata del vetrino.
- ☐ Immergere il vetrino in una vaschetta di acqua distillata sterile.
- ☐ Riempire il capillare della pipetta Pasteur con la sospensione cromosomica.
- ☐ Togliere il vetrino dalla vaschetta e lasciare cadere due gocce di sospensione su metà della superficie del vetrino, tenendolo inclinato di 30° per distribuire la goccia sulla superficie.
- ☐ Asciugare con carta assorbente il retro del vetrino.
- ☐ Lasciare asciugare all'aria per 5 -10 minuti e quindi procedere alla colorazione.

Colorazione con colorante Giemsa (Eosina-Blu di Metilene)

È una metodica che determina la colorazione omogenea di tutti i cromosomi, evidenziandone la dimensione e la morfologia rispetto alla posizione del centromero.
La colorazione con colorante Giemsa si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari: quelli basici (il citoplasma e gli organelli citoplasmatici) fissano l'eosina, acida, e si colorano in rosso-arancio, mentre i componenti a reazione acida (i cromosomi) si colorano in blu con i prodotti di ossidazione del blu di Metilene, basici.

La colorazione si effettua attraverso i seguenti passaggi:

- ☐ Immergere i vetrini per 25 minuti in Giemsa.
- ☐ Sciacquare i vetrini con acqua distillata e lasciare asciugare all'aria.
- ☐ Osservare i vetrini al microscopio ottico.

I vetrini possono essere montati con vetrino coprioggetto in modo permanente utilizzando apposite resine.
(*NB*: tutti i procedimenti per la colorazione vanno effettuati con i guanti).

Cariotipo umano normale o patologico?

Sono disponibili alcune fotografie di cariotipi umani con bandeggio Q, appartenenti a individui diversi di cui non è specificato il sesso e l'eventuale presenza di patologie. Gli studenti dovranno sovrapporre un foglio di acetato alla foto e, utilizzando un pennarello per cancellare i cromosomi durante il conteggio, contare i cromosomi e riconoscere le coppie di omologhi.
Dovranno quindi rispondere alle seguenti domande:
1. Il cariotipo che stai osservando è di un maschio o di una femmina?
2. Riconosci una patologia dal conteggio del numero dei cromosomi?
3. Se sì, di quale patologia si tratta?

Istruzioni per il conteggio dei cromosomi delle immagini allegate

Le metafasi illustrate nelle fotografie sono state ottenute applicando il bandeggio Q (colorazione con quinacrina e osservazione al microscopio a fluorescenza). Gli studenti dovranno prima contare il numero totale di cromosomi e, per formulare una risposta, utilizzare come criterio il conteggio e l'osservazione dei cromosomi acrocentrici corti (21, 22 e Y), simboleggiati nel modo seguente:
^ acrocentrico corto (21 e 22);
^ cromosoma Y (nella foto risulta molto brillante).

1) Femmina normale	46 cromosomi (XX) Cromosomi acrocentrici corti: 4	^ ^ 21 ^ ^ 22
2) Maschio normale	46 cromosomi (XY) Cromosomi acrocentrici: 5	^ ^ 21 ^ ^ 22 **^** Y
3) Down	47 cromosomi (XX) Cromosomi acrocentrici: 5	^ ^ ^ 21 ^ ^ 22
4) Down	47 cromosomi (XY) Cromosomi acrocentrici: 6	^ ^ ^ 21 ^ ^ 22 **^** Y
5) Klinefelter	47 cromosomi (XXY) Cromosomi acrocentrici: 5	^ ^ 21 ^ ^ 22 **^** Y
6) XYY	47 cromosomi (XYY) Cromosomi acrocentrici: 6	^ ^ 21 ^ ^ 22 **^^** Y
7) Turner	45 cromosomi (X0) Cromosomi acrocentrici: 4	^ ^ 21 ^ ^ 22

7. Anche i geni possono diventare reporter

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 μl
- micropipette 20/200 μl
- micropipette 100/1000 μl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- pestelli conici in teflon
- provette da 0,2 ml per PCR
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- piastre
- beuta da 100 ml
- cilindro graduato da 50 ml
- bilancia
- forno a microonde
- apparato per elettroforesi
- nastro adesivo di carta
- alimentatore
- centrifuga
- vortex
- stufa a 37 °C
- termociclatore
- transilluminatore
- termostato a secco
- cappa chimica

Reagenti e materiali biologici

- Piantine di *Arabidopsis thaliana* selvatiche e transgeniche
- **Soluzione di colorazione per saggio GUS**
- **Etanolo assoluto e al 70% v/v**
- **Tampone high-salt**
- Fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1)
- Alcol isopropilico (isopropanolo)
- **TBE 1χ**
- Agarosio in polvere
- Intercalante del DNA (SYBR Safe)
- **Colorante di caricamento per gel di agarosio 2χ**
  (si prepara facendo una diluizione 1:3 della soluzione stock 6χ)
- H_2O distillata sterile
- Acqua 0,1% DEPC (inibitore di RNasi) con DNasi (1 mg/ml)
- dNTPs (10 mM ciascuno)
- Oligo dT 50 μM
- RT buffer 10χ
- **$MgCl_2$ 25 mM**

- DTT (ditiotreitolo, agente riducente) 0,1 M
- RNaseOUT (inibitore della RNasi) 40 U/µl
- Superscript II RT (trascrittasi inversa) 200 U/µl
- Primer forward e primer reverse per GUS
- Primer forward e primer reverse per S16
- Buffer 10χ per PCR
- Taq polimerasi 5 U/µl

Crescita delle piantine di *Arabidopsis thaliana*

Semi sterilizzati di *Arabidopsis* selvatica e transgenica vengono seminati su piastra in condizioni di sterilità, su terreni di crescita contenenti agar, con e senza cadmio (sotto forma di cloruro di cadmio $CdCl_2$). Nella tabella sono indicati i principali componenti del terreno di crescita. I sali elencati forniscono alla pianta i nutrienti (N, Mg, S, K, P, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu, Co, Mo, I) di cui ha bisogno per una corretta crescita, il saccarosio costituisce la fonte di carbonio (in questo caso le piante in piastra si comportano come organismi eterotrofi), l'agar permette al terreno di solidificare. I semi crescono per 10 giorni in una camera di crescita mantenuta a 23 °C, con un fotoperiodo di 16 ore. Al termine del periodo di crescita trasferire le plantule in due serie (4 per il saggio istochimico e 4 per l'estrazione del RNA) di eppendorf da 1,5 ml opportunamente siglate.

NH_4NO_3	20,61 mM
$CaCl_2$	2,99 mM
$MgSO_4$	150 µM
KNO_3	18,79 mM
KH_2PO_4	1,25 mM
H_3BO_3	100 µM
Na_2-EDTA	100 µM
$MnCl_2$	100 µM
$ZnCl_2$	29,91 µM
$Fe_2(CH_4O_6)_3$	184 µM
$CoCl_2$	0,110 µM
$CuCl_2$	0,100 µM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1,030 µM
KI	5 µM
saccarosio	10 g l^{-1}
agar	8 g l^{-1}

Saggio istochimico

- ☐ Aggiungere a ogni provetta 700 µl di soluzione di colorazione per saggio GUS.
- ☐ Incubare le provette per una notte a 37 °C in assenza di luce.
- ☐ Al termine del periodo di incubazione procedere alla decolorazione dei tessuti con etanolo assoluto per 1-2 ore, e quindi all'osservazione delle piante, con il fine di evidenziare eventuali colorazioni indaco.

Estrazione di RNA

- ☐ Aggiungere 500 µl di tampone high-salt alle provette e macerare le piantine con l'ausilio di un pestello.
- ☐ Addizionare sotto cappa chimica alle eppendorf 500 µl di una miscela fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1) e miscelare.

- ☐ Centrifugare a massima velocità per 10 minuti.
- ☐ Recuperare 400 µl di surnatante.
- ☐ Miscelare con 400 µl di H_2O distillata e 560 µl di isopropanolo per favorire la precipitazione degli acidi nucleici.
- ☐ Centrifugare a massima velocità per 10 minuti ed eliminare il surnatante.
- ☐ Lavare il pellet con 1 ml di etanolo al 70% v/v e centrifugare a massima velocità per 5 minuti.
- ☐ Asciugare il pellet in termoblocco e risospendere in 50 µl di acqua DEPC contenente DNAsi.

Determinazione della quantità di RNA estratto mediante elettroforesi

Allo scopo di verificare la qualità dell'RNA, un'aliquota della preparazione viene sottoposta a separazione elettroforetica su gel di agarosio.

- ☐ Aggiungere 8 µl di RNA estratto in una provetta contenente 8 µl di colorante di caricamento in concentrazione 2χ.
- ☐ Centrifugare per pochi secondi.

Preparazione del gel di agarosio

- ☐ Preparare il gel d'agarosio alla concentrazione 1%, secondo le indicazioni del Protocollo "Elettroforesi del DNA", sciogliendo 0,30 gr di agarosio in 30 ml di tampone TBE 1×.

Corsa elettroforetica

- ☐ Caricare sul gel di agarosio 15 µl della miscela di RNA e colorante di caricamento. Seguire le indicazioni contenute nel protocollo "Elettroforesi del DNA".

Analisi dell'espressione del gene reporter attraverso RT-PCR

Si utilizza la tecnica RT-PCR (PCR con retrotrascrizione), che combina la reazione della trascrittasi inversa con una normale tecnica di amplificazione del DNA, per sintetizzare specifiche molecole di cDNA, a partire da uno stampo di mRNA. Partendo dal RNA estratto dalle foglie di *Arabidopsis*, con opportuni primer vengono prodotti cloni parziali di cDNA codificanti per il gene GUS e per un gene di controllo, S16. Quest'ultimo codifica per rRNA della subunità minore dei ribosomi di plastidi e mitocondri e serve come controllo per verificare il funzionamento della reazione di RT-PCR.
Per l'ottenimento del cDNA viene utilizzato il Protocollo SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

Retrotrascrizione

- ☐ Preparare una miscela contenente dNTPs e Oligo dT 1:1.
- ☐ Preparare per ogni campione una provetta da PCR contenente 2 µl di miscela.
- ☐ Aggiungere 8 µl di RNA (contenente circa 1 µg/µl di RNA) e incubare a 65 °C per 5 minuti, per distendere i filamenti di RNA.
- ☐ Mettere in ghiaccio per almeno 1 minuto.
- ☐ Preparare una quantità opportuna di una miscela contenente: 2 µl di RT buffer 10×, 4 µl di $MgCl_2$ 25 mM (per permettere la formazione dei complessi dNTP-Mg^{++}, che sono il substrato della trascrittasi inversa), 2 µl di DTT 0,1 M, 1 µl di RNaseOUT e 1 µl di Superscript II RT.
- ☐ Aggiungere 10 µl in ogni campione.
- ☐ Incubare a 42 °C per 50 minuti.
- ☐ Terminare la reazione portando i campioni a 85 °C per 5 minuti, allo scopo di denaturare l'enzima e bloccare la reazione.

Amplificazione

Le coppie di primer utilizzate per amplificare le sequenze del gene GUS e del gene S16 sono state disegnate facendo riferimento alle sequenze depositate in banca dati (The Arabidopsis Information Resource; http://www.arabidopsis.org).
Le coppie di primer utilizzate e le rispettive temperature di appaiamento o annealing (Ta) sono riportate in tabella.

OLIGO	SEQUENZA	NUM. DI BASI	TA (°C)
GUS forward	ATTACGGCAAAGTGTGGGTC	20	58
GUS reverse	CAGAAAAGCCGCCGACTTCG	20	
S16 forward	GGCGACTCAACCAGCTACTGA	21	54
S16 reverse	CGGTAACTCTTCTGGTAACGA	21	

☐ Preparare due diverse miscele di amplificazione: una per il gene reporter GUS e una per il gene S16.
Le miscele sono così composte:
- primer forward: 1 μl
- primer reverse: 1 μl
- dNTPs: 3 μl
- buffer 10χ: 2 μl
- Taq: 1 μl
- H_2O distillata sterile: 12 μl

☐ Aliquotare 20 μl della miscela di amplificazione in provette da PCR e aggiungere 5 μl del cDNA ottenuto con retrotrascrizione.
☐ Incubare in termoblocco da PCR e impostare il seguente programma:

T°	T´		
94 °C	2´	1 unico ciclo iniziale di denaturazione	
94 °C	45´´	denaturazione	25 cicli (Ta ottimale per i primer di GUS)
58 °C	45´´	annealing	
72 °C	1´	estensione	
72 °C	10´	1 unico ciclo finale di sintesi	
4 °C	∞	(conservazione dei campioni)	

Preparazione del gel di agarosio

Preparare il gel secondo le indicazioni del Protocollo "Elettroforesi del DNA" sciogliendo 0,30 g di agarosio in 30 ml di tampone TBE 1χ.

Corsa elettroforetica

☐ A PCR terminata, miscelare in una provetta 8 μl di prodotto di PCR e 8 μl di colorante di caricamento 2χ.
☐ Centrifugare per pochi secondi.
☐ Caricare su gel di agarosio 15 μl di ogni campione.

Seguire le indicazioni contenute nel Protocollo "Elettroforesi del DNA".

8. Separazione e immuno-rilevamento di proteine

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 μl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- cilindro graduato da 50 ml
- cilindro graduato da 500 ml
- bottiglie di pirex da litro
- vaschette in pirex (8 × 15 cm)
- vaschette in plastica (15 × 25 cm)
- oscillatore
- cella per elettroforesi verticale
- alimentatore
- apparato per trasferimento su membrana (*elettroblotting*)
- griglia per trasferimento
- centrifuga
- termoblocco a secco
- fogli di acetato
- pinzette
- mollette

PRIMA PARTE A
Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE

Reagenti e materiali biologici[1]

Tampone di corsa per SDS-PAGE

- Due estratti proteici da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* trattate con TCA (acido tricloro-acetico) in colorante di caricamento per proteine (gli estratti proteici provengono da un ceppo di lievito irraggiato e da un ceppo non irraggiato con raggi UV).
- Marker di proteine in colorante di caricamento.
- Gel di poliacrilammide PRECAST.
- Blu di Coomassie Safety (Biorad).
- Acqua distillata sterile.

Corsa elettroforetica

- ☐ Incubare 0,5 ml dei due campioni nel termoblocco a 100 °C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle proteine.
- ☐ Centrifugare i campioni per 30 secondi a 13 000 rpm per raccogliere sul fondo il liquido contenuto nella provetta.
- ☐ Aprire i gel precast e sciacquarli dolcemente con acqua distillata; togliere i pettini e le guarnizioni adesive alla base del gel; montare i gel sull'apposito sostegno

[1] Per la preparazione dei reagenti in grassetto si rimanda alla fine dell'Appendice.

- ☐ Riempire lo spazio tra i due gel con il tampone di corsa.
- ☐ Nel primo pozzetto caricare 5 μl del marker di proteine.
- ☐ Caricare 10 μl degli estratti proteici nei pozzetti successivi (seguendo lo schema sottoriportato).

Schema caricamento del gel: PM (marker proteine); – (estratto di proteine da cellule lievito non trattate con raggi UV), + (estratto di proteine da cellule di lievito trattate con raggi UV).

Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 4	Pozzetto 5	Pozzetto 6	Pozzetto 7	Pozzetto 8	Pozzetto 9
PM	+	+	+	Solo colorante	PM	+	-	+

- ☐ Posizionare l'apparato con i gel nella cella elettroforetica e riempirla con il tampone di corsa.
- ☐ Applicare al sistema una differenza di potenziale di 200 V per 40 minuti circa (finché il fronte blu del colorante non si vede quasi "uscire" dal gel).

PRIMA PARTE B
Colorazione del gel con Blu di Coomassie Safety

- ☐ Al termine della corsa ogni gel viene tagliato a metà con un bisturi. Una metà servirà per il trasferimento su membrana (*western blotting*); la seconda metà viene sottoposta alla colorazione con Blu di Coomassie Safety (il colorante si lega alle proteine con interazioni deboli).
- ☐ Porre una metà del gel in una vaschetta e fare 3 lavaggi di 5 minuti con acqua distillata, tenendo il gel in blanda agitazione.
- ☐ Dopo l'ultimo lavaggio aggiungere 50 ml di Blu di Coomassie Safety e lasciare in blanda agitazione per una notte.
- ☐ Trasferire il gel in acqua per rimuovere l'eccesso di colorante; in 5-10 minuti sono visibili numerose bande blu.

SECONDA PARTE A
Trasferimento delle proteine su membrana in PVDF (Polivinildenfluoruro)

Reagenti e materiali[1]

- **Tampone di trasferimento per *western blotting***
- Membrana in PVDF
- Carta da filtro 3M
- Etanolo assoluto
- **PBST, soluzione di lavaggio**
- Soluzione di incubazione con anticorpi primari (**PBST + latte in polvere al 5%**, con anticorpi primari monoclonali di topo Anti-Rad53 diluiti 1:100)
- Soluzione di incubazione con anticorpi secondari (**PBST + latte in polvere al 5%**, con anticorpi secondari di capra coniugati con la perossidasi di rafano, diluiti 1:50 000)
- **Liquidi di sviluppo per la reazione con luminolo: soluzione 1 e 2**
- Lastre fotografiche
- Liquidi di sviluppo e fissaggio per lastre fotografiche

Immuno-decorazione o western blotting

Al termine della corsa elettroforetica, la prima metà di ogni gel è sottoposta a western blotting, ovvero al trasferimento delle bande proteiche dal gel di poliacrilamide a una membrana in PVDF.

- ☐ Preparare la griglia di trasferimento, aprendola in una vaschetta di plastica con la parte nera

[1] Per la preparazione dei reagenti in grassetto si rimanda alla fine dell'Appendice.

appoggiata al fondo.
- ☐ Posizionare in sequenza: una spugnetta bagnata di tampone di trasferimento e un foglio di carta 3M anch'esso imbevuto di tampone.
- ☐ Delicatamente appoggiare il gel sulla carta 3M.
- ☐ Attivare la membrana in PVDF, precedentemente tagliata sull'angolo a destra in alto (per ricordare l'orientamento della membrana) tenendola almeno 10 secondi in una vaschetta di plastica contenente etanolo assoluto: la membrana va sempre maneggiata con i guanti.
- ☐ Posizionare la membrana in PVDF sul gel evitando che si formino bolle.
- ☐ Posizionare un secondo foglio di carta 3M e infine la seconda spugnetta (sempre imbevuti di tampone di trasferimento).
- ☐ Chiudere la griglia(sandwich).
- ☐ Inserire il sandwich nella camera di un apparato per *elettroblotting*
- ☐ Riempire di tampone di trasferimento l'apparato. La struttura dell'apparato è tale per cui il campo elettrico viene applicato perpendicolarmente al piano del sandwich. Il trasferimento viene realizzato applicando un'intensità di corrente di 400 mA per un'ora. Una volta completato il trasferimento, immergere la membrana PVDF in etanolo. Questo passaggio serve per fissare le proteine alla membrana. In etanolo, la membrana diventa trasparente. Lasciarla asciugare su un foglio di carta 3M.

SECONDA PARTE B
Individuazione immunologica di una specifica proteina

Dopo il *western blotting*:
- ☐ Incubare per un ora con la soluzione contenente anticorpi primari (monoclonali di topo diretti contro la proteina Rad53) in blanda agitazione.
- ☐ Effettuare 3 lavaggi della membrana come segue:
  - rimuovere la soluzione di incubazione;
  - immergere la membrana in PBST per 5 minuti; cambiare il liquido di lavaggio e ripetere l'operazione due volte.
- ☐ Incubare la membrana con la soluzione di incubazione contenente gli anticorpi secondari (anticorpi di capra diretti contro gli anticorpi di topo) per 45 minuti.
- ☐ Effettuare 3 lavaggi della membrana come segue:
  - rimuovere la soluzione di incubazione.
  - immergere la membrana in PBST per 5 minuti; cambiare il liquido di lavaggio e ripetere l'operazione due volte.

E ora al BUIO!

In una camera oscura, illuminata solo da due lampade a luce rossa, preparare due vasche di plastica, una con il liquido di sviluppo e una con il liquido di fissaggio, una vasca di plastica con acqua distillata, una lastra fotografica ben chiusa, fogli di acetato, pinzette, un pennarello.
- ☐ Preparare le soluzioni 1 e 2 in quantità opportune in relazione al numero di membrane da sviluppare (per ogni membrana occorrono 5 ml di soluzione 1 e 5 ml di soluzione 2).
- ☐ Spostare la membrana in una vaschetta, versarvi prima la soluzione 1 e poi la soluzione 2.
- ☐ Incubare la membrana per 3 minuti: il luminolo viene ossidato dall'ossigeno liberato dall'azione della perossidasi (coniugata agli anticorpi secondari) sull'acqua ossigenata, con concomitante produzione di luce.
- ☐ Posizionare la membrana tra due fogli di acetato.
- ☐ Segnare con un pennarello i quattro angoli della membrana e la posizione delle bande del marker.
- ☐ Sovrapporre una lastra fotografica e tenere coperto e fermo 3 minuti esercitando una leggera pressione.
- ☐ Rimuovere la lastra con una pinzetta e immergerla nella vasca contenente il liquido di sviluppo fino a comparsa delle bande.
- ☐ Sciacquare la lastra nella vasca piena d'acqua e passarla nella vasca con il liquido di fissaggio fino a che non diventa trasparente.
- ☐ Appendere con due mollette la lastra ad asciugare

11. Le forme invisibili

PROTOCOLLO DI CRISTALLIZZAZIONE

Nell'esperimento la proteina lisozima viene cristallizzata mediante la tecnica della diffusione di vapore (in configurazione di "goccia seduta" o *sitting drop*), equilibrando una goccia contenente una miscela 1:1 di proteina e di soluzione di cristallizzazione contro la stessa soluzione, contenuta in un pozzetto sottostante la goccia (fig. 1). Sono utilizzate due diverse condizioni sperimentali per identificare le condizioni ottimali di cristallizzazione. Per questo esperimento la soluzione di cristallizzazione è costituita da una miscela di Na-acetato e NaCl.

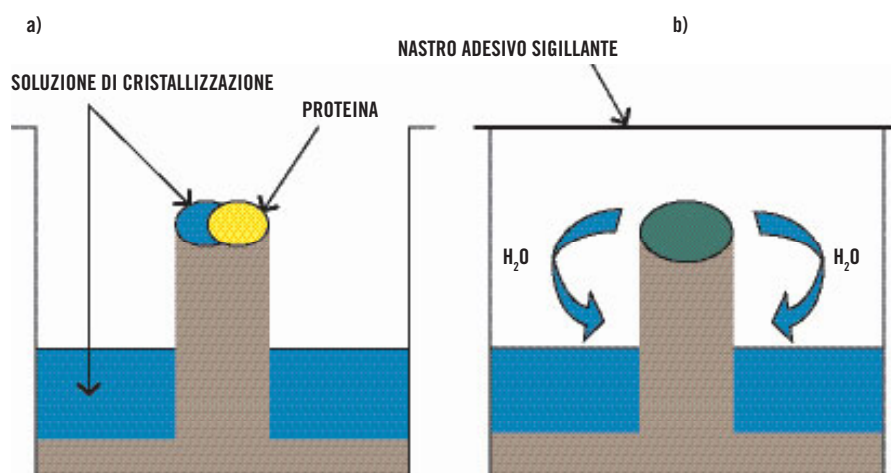



Figura 11.1
Il metodo della diffusione di vapore è una delle tecniche usate più frequentemente per ottenere cristalli di una proteina. (a) Una goccia di proteina di alcuni µl viene mescolata ad una goccia di pari volume di soluzione di cristallizzazione prelevata dal pozzetto. (b) Il pozzetto viene sigillato ed il processo di cristallizzazione comincia sfruttando la distillazione di H_2O dalla goccia al pozzetto (diffusione di vapore).

Apparecchiature e strumentazioni

- micropipette 2/20 µl
- micropipette 20/200 µl
- micropipette 100/1000 µl
- puntali
- provette da 1,5 ml
- provette falcon da 15 ml
- portaprovette
- piastre per cristallizzazione
- microscopio

Reagenti e materiali[1]

- **Soluzione precipitante: 100 ml di NaCl 20% w/v**
- Soluzione tampone: 100 ml di Na-acetato (pH 4,6) 3M
- **Lisozima 40 mg/ml**.

[1] Per la preparazione dei reagenti in grassetto si rimanda alla fine dell'appendice.

Preparazione delle prove di cristallizzazione

- Pipettare 0,5 ml di soluzione di cristallizzazione (composta da soluzione precipitante + soluzione tampone + H_2O) in due pozzetti adiacenti della piastra di cristallizzazione seguendo lo schema indicato in Tabella.

Pozzetto 1		Pozzetto 2	
NaCl 20%	**200 µl**	NaCl	**225 µl**
Tampone Na-acetato 3M pH 4,6	**25 µl**	Tampone Na-acetato 3M pH 4,6	**25 µl**
H_2O	**275 µl**	H_2O	**250 µl**
Si ottengono le seguenti condizioni di cristallizzazione:			
Pozzetto 1		**Pozzetto 2**	
NaCl 8%		NaCl 9%	
tampone acetato pH 4,6 0,15 M		tampone acetato pH 4,6 0,15 M	

- ☐ Pipettare 2 µl di soluzione proteica nel ponticello presente al centro del pozzetto di cristallizzazione.
- ☐ Aggiungere alla soluzione proteica 2 µl di soluzione di cristallizzazione (presa dal fondo del pozzetto) e mescolare. La goccia finale avrà quindi un volume di 4 µl.
- ☐ Sigillare il sistema goccia-pozzetto con il nastro adesivo trasparente per prevenire l'evaporazione della goccia e garantire il corretto raggiungimento dell'equilibrio di vapore necessario per la cristallizzazione della proteina.
- ☐ Mantenere le prove di cristallizzazione alla temperatura costante di 21 °C per alcune ore (minimo 2) in condizioni di assoluta immobilità.
- ☐ La formazione dei cristalli è monitorata mediante osservazione al microscopio ottico dopo 2 ore. Per raggiungere la loro dimensione massima i cristalli impiegheranno alcuni giorni. Paragonando i risultati ottenuti nelle due prove di cristallizzazione è possibile identificare la migliore condizione di cristallizzazione della proteina.

Elenco dei reagenti utili per le esperienze di laboratorio

In questo elenco troverete tutti i reagenti (in ordine alfabetico) che servono per le attività illustrate nel libro. Di alcuni reagenti segnaliamo anche la marca per evitare confusioni nell'acquisto del prodotto.

- ACIDO BORICO (H_3BO_3)
- ACIDO CLORIDRICO (HCl) 37%
- ACIDO ETILENDIAMINOTETRACETICO (EDTA)
- ACIDO PARACUMARICO ($C_9H_8O_3$)
- ACIDO TRICLOROACETICO (CCl_3COOH)
- ACQUA OSSIGENATA (H_2O_2)
- AGAR
- AGAROSIO
- AMMONIO ACETATO $NH_4(CH_3COO)$
- AMPICILLINA
- ANTICORPI PRIMARI MONOCLONALI DI TOPO ANTI-RAD53
- ANTICORPI SECONDARI DI CAPRA ANTI TOPO CONIUGATI CON LA PEROSSIDASI DI RAFANO
- ATP
- BLU DI BROMOFENOLO
- BLU DI COOMASSIE SAFETY (BIORAD)
- BSA 1 mg/ml (albumina di siero bovino)
- CLORURO DI MAGNESIO ($MgCl_2$)
- CLORURO DI SODIO (NaCl)
- DIETIL PIROCARBONATO (DEPC)
- DIIDROGENOFOSFATO DI SODIO NaH_2PO_4
- DIIDROGENOFOSFATO MONOSODICO (NaH_2PO_4)-$2H_2O$
- DIMETILFORMAMMIDE
- DIMETILSULFOSSIDO (DMSO)
- DISODIO-EDTA DIIDRATO ($Na_2EDTA_2H_2O$)
- DISODIOIDROGENO FOSFATO (Na_2HPO_4)-$2H_2O$
- DITIOTREITOLO (DTT)
- DNAsi
- dNTPs (10 mM ciascuno)
- ESTRATTO DI LIEVITO
- ETANOLO ASSOLUTO (C_2H_5OH)
- ETIDIO BROMURO
- FENOLO/CLOROFORMIO/ISOAMIL ALCOL (25:24:1)
- FERRICIANIDE DI POTASSIO $K_3Fe(CN)_6$
- FERRICIANIDE DI POTASSIO TRIIDRATO $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$
- GIEMSA (REAGENTE PER MICROSCOPIA; CONTIENE ALCOL METILICO, AZZURRO EOSINA, BLU DI METILENE) codice Carlo Erba 45361301
- GLICEROLO ($C_3H_5(OH)_3$)
- GLICINA
- IDROSSIDO DI SODIO (NaOH)
- IDROSSIFOSFATO DISODICO (Na_2HPO_4)-$2H_2O$
- INTERCALANTE DEL DNA (SYBR SAFE)
- IPOCLORITO DI SODIO (candeggina) 7%
- ISOPROPANOLO (C_3H_7OH)
- ISOPROPIL ß-D-TIOGALATTOPIRANOSIDE (IPTG)
- LATTE IN POLVERE
- LIQUIDI DI SVILUPPO E FISSAGGIO PER LASTRE FOTOGRAFICHE
- LISOZIMA
- LUMINOLO (3-AMINOPHTHALYDRAZIDE)
- MARCATORE DI PESO MOLECOLARE PER DNA (negli esperimenti di questo libro è stato usato pUC18 tagliato con *HaeIII)*
- MARCATORE DI PESO MOLECOLARE PER PROTEINE
- METANOLO (CH_3OH)
- MONOIDROGENOFOSFATO DI SODIO (Na_2HPO_4)
- N-LAUROYL SARCOSINE o N-METIL-N-(1-OSSODODECIL)-GLICINA ($C_{15}H_{29}NO_3$)
- Oligo-dT 50 µM
- PLASMIDE pUC19 DIGERITO CON EcoRI
- PROTEINASI K
- pUC19
- RNasi A
- RNaseOUT (inibitore RNasi) 40 U/µL
- RT BUFFER 10x
- SACCAROSIO ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
- SODIO ACETATO 3M (pH 4,6)
- SODIO DODECILSOLFATO (SDS)
- SODIOMETABISOLFITO ($Na_2S_2O_5$)
- SOLFATO DI SODIO (Na_2SO_4)
- SUPERSCRIPT II RT 200 U/ µl (trascrittasi inversa)
- T4 DNA ligasi
- TAQ BUFFER 10χ con $MgCl_2$
- TAQ POLIMERASI 5 U/µl
- TRIPTONE
- TRIS (IDROSSIMETIL)AMINOMETANO (Tris)
- TRITON χ100
- TWEEN 20 (POLIOSSIETILENSORBITAN MONOLAURATO)
- UREA
- X-GAL
- X-GLUC
- XILENE CIANOLO

SOLUZIONI STOCK[1]

Ampicillina 1000X (100 mg/ml)

Sciogliere 100 mg di ampicillina in polvere (usare i guanti) in 1 ml di acqua distillata e conservare a -20°C.

EDTA 0,5M pH 8,0

		[ ] finale
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	186,1 g	0,5 M
NaOH compresse	circa 20 g	

Portare a 1000 ml con acqua distillata

In 600 ml di acqua distillata sciogliere $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (peso molecolare 372,2); portare il pH a 8 aggiungendo compresse di NaOH e controllando il pH con pH-metro o con cartine tornasole (fare attenzione ad aggiungere NaOH poco per volta, perché la reazione è esotermica e NaOH è una base molto forte). Portare a volume con acqua distillata sterilizzata in autoclave. Autoclavare la soluzione ottenuta e conservare a temperatura ambiente.

Ferricianide 100mM

Sciogliere 422 mg di $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ e 329 mg di $K_3Fe(CN)_6$ in 10 ml di acqua distillata. Conservare al buio a +4 °C.

NaCl 5M

Sciogliere 292,2 g di NaCl in 800 ml di acqua distillata, quindi portare il volume a 1000 ml con acqua distillata. Autoclavare e conservare a temperatura ambiente.

NaCl 20% w/v

Sciogliere 200 g di NaCl in 800 ml di acqua distillata, quindi portare il volume a 1000 ml con acqua distillata. Autoclavare e conservare a temperatura ambiente.

NaOH 10M

Sciogliere 80 g di NaOH in 200 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente.

RNasi A (10 mg/ml)

Sciogliere l'enzima in acqua distillata (10 mg/ml). Aliquotare e conservare a –20 °C.

PBS 10×

		[ ] finale
NaCl 5M	200 ml	1 M
$NaH_2PO_4 – 2H_2O$	11,7 g	0,075M
$Na_2HPO_4 – 2H_2O$	56,95 g	0,320 M

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Portare la soluzione a pH 7,4 con NaOH 10M, usando il pH-metro o cartina tornasole. Conservare la soluzione a temperatura ambiente.

SDS 20%

Mettere 200 g di SDS in 900 ml di acqua distillata: scaldare a +68 °C e sciogliere con un agitatore magnetico a bassa velocità. Se necessario, aggiustare il pH a 7,2 aggiungendo poche gocce di HCl, controllando il pH con pH-metro o con cartine tornasole. Portare il volume a 1000 ml. Non autoclavare. Conservare a temperatura ambiente.

Tampone di ligazione 10×

		[ ] finale
Tris-HCl 1M pH 7,6	2 ml	0,2 M
$MgCl_2$	102 mg	50 mM
DTT	77 mg	50 mM
BSA	5 mg	500 µg/ml
ATP	28 mg	5 mM

Portare a 10 ml con acqua distillata

Fare aliquote da 50 µl da conservare a –20°C.

Tampone fosfato 100 mM

Preparare 250 ml di soluzione A e 250 ml di soluzione B aventi le seguenti composizioni:
- soluzione A: 2,999 g di NaH_2PO_4 in 250 mL di acqua distillata;
- soluzione B: 3,549 g di Na_2HPO_4 in 250 mL di acqua distillata.

Miscelarle fino a raggiungere pH 7, controllando il pH con pH-metro o con cartine tornasole. Conservare a temperatura ambiente.

TBE (Tris-borato-EDTA) 10X

		[ ] finale
Tris	108 g	0,89 M
EDTA 0,5 M pH 8,0	**40 ml**	**0,02 M**
Acido Borico	55 g	0,89 M

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Conservare a temperatura ambiente.

Tris glicina 10×

		[ ] finale
Tris	30,30 g	0,25 M
Glicina	150,14 g	2 M

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Il pH deve essere 8,3-8,7. In caso fosse troppo alto, aggiungere qualche grammo di glicina. Conservare a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1M pH 6,8

		[ ] finale
Tris	121,14 g	1M
HCl 37%	circa 80 ml	

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Sciogliere in 700 ml di acqua distillata 121,14 g di Tris, portare a pH 6,8 aggiungendo HCl 37% (circa 80 ml), controllandone il valore con pH-metro o con cartina tornasole; portare a volume con acqua distillata e autoclavare. Conservare a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1M pH 7,6

		[ ] finale
Tris	121,14 g	1M
HCl 37%	circa 60 ml	

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Sciogliere in 700 ml di acqua distillata 121,14 g di Tris, portare a pH 7,6 aggiungendo HCl 37% (circa 60 ml), controllandone il valore con pH-metro o con cartina tornasole; portare a volume con acqua distillata e autoclavare. Conservare a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1M pH 8,0

		[ ] finale
Tris	121,14 g	1M
HCl 37%	circa 40 ml	

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Sciogliere in 700 ml di acqua distillata 121,14 g di Tris, portare a pH 8 aggiungendo HCl 37% (circa 40 ml), controllandone il valore con pH-metro o con cartina tornasole; portare a volume con acqua distillata e autoclavare. Conservare a temperatura ambiente.

Soluzioni utilizzate per gli esperimenti

(in rosso, tra parentesi, il numero del capitolo di riferimento).

Ammonio acetato 5M [5]

Sciogliere 335 g di ammonio acetato in 800 ml di acqua distillata; portare al volume di 1 litro e sterilizzare per filtrazione. L'ammonio acetato è utilizzato per l'estrazione del DNA: consente la precipitazione del DNA in presenza di isopropanolo ed etanolo. Questi alcoli impoveriscono lo strato d'idratazione attorno agli acidi nucleici, lasciando così esposte le cariche negative dei gruppi fosfato. Se in soluzione ci sono cationi (come lo ione ammonio NH_4^+), questi neutralizzano le cariche negative, inducendo aggregazione e precipitazione degli acidi nucleici.

Colorante di caricamento per gel di agarosio (6×) [1, 2, 3, 4, 5, 7]

		[ ] finale
Blu di bromofenolo	25 mg	0,25%
Xilene cianolo	25 mg	0,25%
Glicerolo	3 ml	30% v/v

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Conservare a +4 °C.

Si utilizza per l'elettroforesi di DNA su gel di agarosio. Il glicerolo presente nel colorante di caricamento serve a rendere più densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e, quindi, a facilitare la deposizione del campione nel pozzetto. Il blu di bromofenolo e lo xilene di cianolo, coloranti a carica negativa, migrano verso il polo positivo a diverse velocità, separandosi: nella zona tra i due coloranti migrano la maggior parte dei frammenti di DNA. Quando la banda del blu di bromofenolo (che migra più velocemente) si approssima alla fine del gel, si può interrompere la corsa.

Colorante di caricamento per gel di proteine (2×) [8]

		[ ] finale
Tris-HCl 1M pH 6,8	1,25 ml	125 mM
SDS 20%	2 ml	4% w/v
Glicerolo	2 ml	20% v/v
Blu di bromofenolo	2 mg	0,2% w/v
DTT	0,31 g	200 mM

Portare a 10 ml con acqua distillata

Si utilizza per il caricamento di campioni proteici durante SDS-PAGE. Il Tris-HCl è un tampone che mantiene il pH a 6,8. SDS e DTT denaturano le proteine: il primo conferisce a tutte le proteine cariche negative, cosicché la loro migrazione sarà influenzata solo dal peso molecolare; il secondo rompe i ponti disolfuro. Il glicerolo appesantisce i campioni, facilitandone il caricamento, mentre il blu di bromofenolo è un colorante di piccole dimensioni carico negativamente che migra verso il polo positivo più velocemente delle proteine.

Etanolo al 70% (v/v) [4, 5, 7]

In un cilindro graduato misurare 70 ml di etanolo assoluto, quindi aggiungere acqua distillata fino a 100 ml. L'etanolo è usato per la precipitazione degli acidi nucleici.

Extraction Buffer (EB) [5]

		[ ] finale
EDTA 0,5M pH 8	140 ml	70 mM
Tris-HCl 1M pH 8	200 ml	200 mM
NaCl 5M	400 ml	2 M
Sodiometabisolfito	3,8 g	20 mM
DTT	0,31 g	200 mM

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Questo tampone si utilizza per l'estrazione di DNA: il Tris-HCl mantiene il pH a 8 e interagisce con i lipopolisaccardi di membrana, destabilizzandola, insieme all'EDTA, che, interagendo con gli ioni bivalenti Ca e Mg, inibisce anche possibili nucleasi. Il sale NaCl dissocia il DNA dalle proteine della cromatina. Il sodiometabisolfito è un antiossidante che protegge il DNA da danni ossidativi.

IPTG 0,1M (24 mg/ml) [4]

Sciogliere 0,24 g di IPTG in 10ml di acqua distillata, filtrare e mettere in una provetta falcon da 15 ml. Conservare a –20° C. IPTG (un analogo del lattosio) fa da induttore per l'operone *lac*, ossia si lega al repressore consentendo la trascrizione del gene *lacZ* (β-galattosidasi).

QUALCHE ESERCIZIO E SEMPLICI CALCOLI

Ricordarsi che:

- il peso molecolare è la somma dei pesi atomici
- il numero di moli corrisponde a peso in grammi/peso molecolare
- la molarità (M) corrisponde al numero di moli in un litro di soluzione

Cosa significa fare una soluzione 1M?
Vuol dire pesare una quantità in grammi di un prodotto pari al suo peso molecolare e scioglierlo in un litro di acqua distillata.

Ad esempio: **preparazione di un litro di NaCl 1M**
Si pesa una quantità in grammi di NaCl pari al suo peso molecolare (58,44; i pesi molecolari si trovano indicati sulle bottiglie dei reagenti) e si scioglie il prodotto in acqua distillata fino al volume finale di 1 litro.

Preparazione di un litro di NaCl 1 mM
Pesare 1/1000 di mole di NaCl, cioè 0,05844 g, e scioglierlo in un litro di acqua distillata. Alternativamente, diluire 1:1000 una soluzione 1M.

Come fare le diluizioni
Un paio di esempi
Diluizioni 1/10 : mettere 1 ml di una sostanza in 9 ml di acqua distillata (volume finale 10 ml).
Diluizioni 1/20: mettere 0,5 ml di una sostanza in 9 ml di acqua distillata (volume finale 10 ml).

LB = Lysogeny Broth [4]

Mettere in un becker 800 ml di acqua distillata e, mentre è in agitazione, aggiungere le polveri. Lasciar sciogliere completamente e portare a volume. Distribuire in bottiglie e autoclavare.
LB è un terreno di coltura i cui componenti, estratto di lievito e peptidi ottenuti da digestione di caseina con tripsina, forniscono carboidrati, aminoacidi, nucleotidi, sali e vitamine per la crescita batterica. Il sale NaCl serve per creare un ambiente isotonico.

		[ ] finale
Triptone	10 g	1% w/v
Estratto di lievito	5 g	0,5% w/v
NaCl	10 g	1% w/v

Portare a 1000 ml con acqua distillata

LB + ampicillina [4]

Al terreno LB, dopo autoclavatura e raffreddamento (almeno 50 °C), aggiungere ampicillina (usando i guanti): 100 µl di **ampicillina 1000**× in 100 ml di brodo sterile (100 µg/ml di ampicillina finale).
L'aggiunta dell'antibiotico ampicillina al terreno LB serve a selezionare la crescita dei soli batteri che presentano il carattere di resistenza a questo antibiotico.

LB + Agar + ampicillina [4]

Preparare il terreno LB e addizionare 15 g/l di agar prima di autoclavare.
Lasciar raffreddare a circa 50 °C, quindi aggiungere l'ampicillina (usando i guanti):
100 µl di **ampicillina 1000**× in 100 ml di brodo sterile (100 µg/ml di ampicillina finale).
Versare 15/20 ml per piastra: con 1 litro si ottengono circa 50 piastre. Lasciar solidificare e riporre le piastre a +4 °C capovolte.
L'agar serve a rendere solido il terreno LB: è un polisaccaride estratto da alcune alghe rosse, si scioglie nel terreno di coltura a temperatura superiore a 80 °C e gelifica sotto i 40 °C.

Liquidi di sviluppo per la reazione Luminolo [8]
Soluzione 1

		[ ] finale
*Luminolo (44 mg/ml in DMSO)	2 ml	
**Acido paracumarico (15 mg/ml in DMSO)	0,8 ml	
Tris-HCl 1M pH 8,0	20 ml	0,1 M

Portare a 200 ml con acqua distillata

*Preparare aliquote da 2 ml di luminolo (44 mg/ml) in DMSO e conservare a –80 °C.
**Preparare aliquote da 1 ml di acido paracumarico (15 mg/ml) in DMSO e conservare a –80 °C.

Conservare la soluzione a +4 °C avvolta in carta stagnola.

Soluzione 2

		[ ] finale
H_2O_2 al 30%	120 µl	
Tris-HCl 1M pH 8,0	20 ml	0,1 M

Portare a 200 ml con acqua distillata

Conservare la soluzione +4 °C avvolta in carta stagnola.

Il luminolo sviluppa una chemioluminescenza bluastra in seguito a reazione con l'ossigeno, che in questo caso è prodotto dalla scissione di acqua ossigenata ad opera dell'enzima perossidasi (legato

all'anticorpo secondario). La luce serve a impressionare una lastra fotografica, individuando così la proteina ricercata.

Lisozima 10 mg/ml [4]

Sciogliere 100 mg di lisozima in 10 ml di acqua distillata; sterilizzare mediante filtrazione e conservare a –20 °C. Si utilizza per l'estrazione di DNA da batteri: questo enzima causa la rottura della parete batterica di peptidoglicano.

Lisozima 40 mg/ml [11]

Sciogliere 400 mg di lisozima in 10 ml di acqua distillata. Conservare a –20 °C.

Miscela di ligazione [4]

		[ ] finale
Plasmide pUC19 digerito con *Eco*RI	50 ng	
DNA esogeno digerito con *Eco*RI	30 ng	
Tampone di ligazione 10X	1 µl	
T_4 DNA ligasi	1 µl	

Portare a 10 µl con acqua distillata

Incubare a +14 °C per una notte e conservare a –20 °C in provette da 1,5 ml.

Si utilizza per trasformare batteri resi competenti. Contiene i prodotti di ligazione del plasmide e del frammento di DNA esogeno, tagliati con lo stesso enzima di restrizione: si possono formare plasmidi ricombinanti, plasmidi che si sono richiusi su se stessi, frammenti di DNA legati fra loro.

PBST 1× [8]

Diluire 1:10 il PBS 10X e aggiungere 2 ml di Tween (concentrazione finale: 0,2% v/v).
Questa soluzione si utilizza per il western bloting e per i successivi lavaggi della membrana di trasferimento.
Il PBS è una soluzione isotonica tamponata. L'aggiunta di Tween, un detergente, serve a ridurre i legami aspecifici delle biomolecole a una superficie solida (membrana di trasferimento).

PBST + latte in polvere [8]

Sciogliere 5 g di latte in polvere in 100 ml di PBST 1 ×. Conservare a +4 °C per non più di tre giorni.
Questa soluzione si utilizza per diluire gli anticorpi primari e secondari per l'immunorilevamento di proteine. Il PBS è una soluzione isotonica tamponata: l'aggiunta di Tween e di latte riduce la formazione di legami aspecifici.

Proteinasi K [4]

Sciogliere 20 mg/ml in acqua distillata, aliquotare e conservare a –20 °C. La proteinasi K digerisce le proteine e inattiva le nucleasi. DNasi e RNasi. È un enzima comunemente utilizzato per l'estrazione di acidi nucleici.

Soluzione A (per estrazione di DNA) [4]

		[ ] finale
Saccarosio	80 g	8%
EDTA 0,5M pH8	100 ml	50 mM
Tris-HCl 1M pH8	10 ml	10 mM
Triton X-100	4,67 ml	0,5% v/v

Portare a 1000 ml con acqua distillata

In 700 ml di acqua distillata sciogliere il saccarosio, aggiungere EDTA e Tris-HCl, portare a volume e autoclavare; dopo autoclavatura, a soluzione fredda, aggiungere Triton X-100. Conservare le bottiglie a +4 °C.

Questa soluzione si usa per l'estrazione di DNA. Il saccarosio aiuta nella rottura delle cellule, richiamando acqua dall'interno per osmosi; il Triton è un detergente non carico che permeabilizza le membrane e denatura le proteine, dissolvendo le interazioni idrofobiche e i legami idrogeno; aiuta a separare gli acidi nucleici dalle proteine e inibisce le nucleasi. L'EDTA destabilizza le membrane.

Soluzione di colorazione per saggio GUS [7]

		[ ] finale
Tampone fosfato 100 mM	25 µl	50 mM
Ferricianide 100 mM	250 µl	0,5 mM
Triton X-100	50 µl	0,1 % v/v
X-Gluc in DMSO (25 mg in 500 µl)	500 µl	0,5 mg/ml

Portare a 50 ml con acqua distillata

Una volta portato a volume, filtrare e conservare a -20 °C.

Questa soluzione è usata per il saggio GUS. X-Gluc fa da substrato per l'enzima β-glucoronidasi (il prodotto del gene GUS): X-Gluc è scisso dall'enzima, formando acido glucoronico e una molecola che, dopo dimerizzazione, forma un composto blu insolubile. Il tampone fosfato mantiene il pH nel mezzo di reazione; la ferricianide accelera la formazione del prodotto finale e ne previene l'ossidazione; il Triton X-100 è un tensioattivo che permeabilizza le membrane e consente l'ingresso di X. Gluc nelle cellule.

Tampone high-salt [7]

		[ ] finale
urea	168 g	2,8 M
Na_2SO_4	50 g	0,35 M
Tris-HCl 1M pH8	200 ml	0,2 M
EDTA 0,5 M	16 ml	8 mM
N-Lauroyl-Sarcosina	10 g	37 mM

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Il pH deve essere 8. Filtrare e conservare a +4 °C.

Questo tampone è usato per l'estrazione di RNA: rompe le cellule e permette di estrarne il contenuto. N-Lauroyl-Sarcosina è un detergente anionico usato per solubilizzare proteine e lipoproteine di membrana ed è utilizzato per la lisi cellulare durante l'estrazione di RNA. Il Tris-HCl mantiene il pH a 8, l'EDTA destabilizza le membrane interagendo con gli ioni bivalenti di Ca^{++} e Mg^{++}.

Tampone di corsa per SDS-PAGE (Tris glicina SDS) [8]

		[ ] finale
Tris glicina 10χ	100 ml	0,025 M e 0,2 M rispettivamente
SDS 20%	5 ml	0,1%

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Questo tampone è utilizzato per l'elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Il Tris mantiene stabile il pH a 8; gli ioni di glicina servono per il passaggio di corrente; SDS (un detergente fortemente anionico) mantiene le proteine denaturate e cariche negativamente.

Tampone di trasferimento (per *western blotting*) [8]

		[ ] finale
Tris glicina 10χ	100 ml	0,025 M e 0,2 M
Metanolo	70 ml	7%

Portare a 1000 ml con acqua distillata

Il Tris mantiene stabile il pH a 8 ; gli ioni di glicina (punto isoelettrico = pH 6,06) servono per il passaggio di corrente. Il metanolo serve a fissare le proteine sulla membrana di trasferimento.

TBE 1X [1, 2, 3, 4, 5, 7]

Diluire 1:10 la soluzione di **TBE 10**×.

Il **TBE 1**× si usa come tampone di corsa per l'elettroforesi su gel di agarosio e per preparare il gel stesso. Il Tris mantiene stabile il pH a 8; $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ è un chelante degli ioni Ca^{++}, Mg^{++}, Zn^{++} e inibisce le nucleasi che richiedono cationi bivalenti per funzionare, per cui il DNA non è degradato; l'acido borico fornisce l'appropriata forza ionica al tampone.

TE [4]

		[ ] finale
EDTA 0,5M pH 8,0	1 ml	1 mM
TrisHCl 1M pH 8,0	5 ml	10 mM

Portare a 500 ml con acqua distillata

Si utilizza nell'estrazione di acidi nucleici: li solubilizza e li protegge dalla degradazione.

TE + RNasi A (50 µg/ml) [4]

Addizionare 50 µl **RNasi A (10 mg/ml)** in 10 ml di TE.

L'enzima RNAsi A degrada le molecole di RNA: in questo modo nella soluzione di TE contenente gli acidi nucleici estratti è possibile isolare il solo DNA.

X-Gal (40 mg/ml) [4]

Sciogliere 0,4 g di X-Gal in 10 ml di dimetilformamide (lavorare sotto cappa) e mettere in una provetta da 15 ml (usare vetro o polipropilene): avvolgerla in carta d'alluminio per mantenerla al buio e conservare a –20 °C.

X-Gal fa da substrato per la β-galattosidasi: una volta scisso dall'enzima, in seguito a dimerizzazione, forma un precipitato blu.

Cinzia Grazioli Cristina Gritti Paolo Plevani Giovanna Viale

Studenti in laboratorio

Esperimenti di biologia molecolare e bioinformatica

Fare un'esperienza di laboratorio durante il percorso scolastico può essere un'occasione indimenticabile, che però in molti casi è accessibile solo a un numero limitato di studenti. Le dodici esperienze contenute in questo libro offrono la possibilità di conoscere e di provare le metodologie e le tecniche della ricerca scientifica in campi quali la **genetica**, la **biologia molecolare** e la **bioinformatica**. Partendo da uno scenario reale, gli studenti sono posti di fronte a un problema e stimolati a cercare una soluzione allestendo un esperimento, per poi discutere criticamente i risultati, applicando il metodo scientifico proprio come si fa in un vero laboratorio di ricerca.

Queste esperienze sono proposte dal CusMiBio (Centro Università – Scuola per la diffusione delle Bioscienze e delle Biotecnologie), che ha sviluppato, presso l'Università degli Studi di Milano, un progetto di collegamento tra ricerca e scuola per rispondere alle esigenze di aggiornamento su bioscienze e biotecnologie.

Nel libro

- **Chi è il colpevole?** Determinazione del «profilo del DNA» per stabilire l'identità personale a livello molecolare e identificare l'autore di un reato.
- **Che cos'è un organismo geneticamente modificato (OGM)?** Come si può evidenziare la presenza di un transgene in un organismo vegetale?
- **Sano o malato?** I polimorfismi di restrizione del DNA per la diagnosi di alcune malattie genetiche.
- **Clonaggio del DNA: bianco o blu?** Come trasformare un batterio con un plasmide «ricombinante» che contiene un tratto di DNA esogeno: l'ingegneria genetica come strumento della ricerca e le sue applicazioni biomediche.
- **Le analisi cromosomiche.** Per conoscere le metodologie usate in citogenetica umana per lo studio dei cromosomi e imparare a riconoscere e interpretare cariotipi normali e patologici.

Su **http://aulascienze.scuola.zanichelli.it** trovi:
- video e interviste a scienziati e ricercatori
- notizie e blog per discutere di scienza
- le rubriche degli esperti di matematica, fisica e chimica per rispondere alle tue domande